

FT

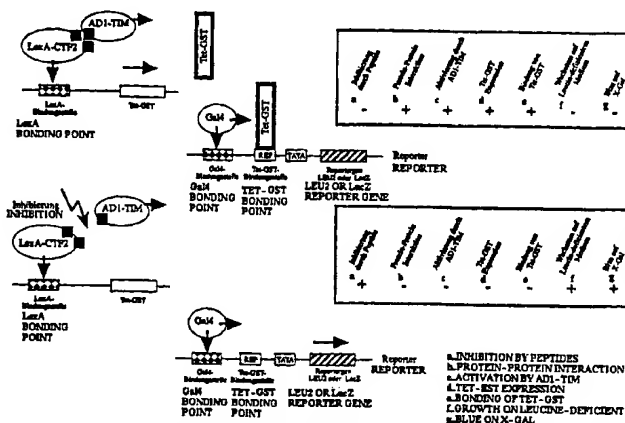
(54) Title: METHOD OF DETERMINING THE ACTIVITY OF A REGULATORY FACTOR, AND USE OF THE METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT EINES REGULATORISCHEN FAKTORS SOWIE VERWENDUNG DIESES VERFAHRENS

This invention concerns a method of determining the activity of a regulatory factor, this activity being detected by means of a reporter system. To this end, gene arrays are provided for a first and second regulatory factor and for one or more reporter systems. The active first regulatory factor affects the activity or expression of the second regulatory factor which affects, in turn, the reporter system. Following addition of an inhibitory component, the activation of the reporter system is detected by the interaction between the first and second regulatory factors.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines regulatorischen Faktors, die über ein Reportersystem nachweisbar ist. Hierzu werden Genanordnungen für einen ersten und zweiten regulatorischen Faktor sowie für ein auf die Aktivität oder Expression der Zugabe einer inhibitorischen Komponente des ersten und zweiten regulatorischen

### REPRESSION OF THE PROTEIN-PROTEIN INTERACTION BETWEEN LexA-CTF2 AND AD1-TIM IN THE REPRESSOR-DEPENDENT PROCESS



- a. INHIBITION BY PEPTIDES
- b. PROTEIN-PROTEIN INTERACTION
- c. ACTIVATION BY ADL-TM
- d. TET-EST EXPRESSION
- e. BONDING OF TET-OST
- f. GROWTH ON LEUCINE-DEFICIENT MEDIUM
- g. BLUE ON X-GAL

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines regulatorischen Faktors sowie  
Verwendung dieses Verfahrens

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von regulatorischen Faktoren, wobei diese Aktivität über die Aktivität eines Reportersystems nachweisbar ist.

- 10 In lebenden Zellen werden Stoffwechselleistungen entweder kontinuierlich oder aber nur in bestimmten Entwicklungsphasen bzw. auf Grund äußerer Signale hin erbracht. Bei der durch Hormone vermittelten Signalübertragung etwa werden die entsprechenden Signale über Wechselwirkungen zwischen
- 15 Proteinen von der äußeren Zellmembran in das Zellinnere hinein transportiert um dort, beispielsweise im Zellkern, in eine Aufforderung zur Teilung umgesetzt zu werden. Werden diese Wechselwirkungen gestört, kann dies eine gesunde Zelle aus dem Gleichgewicht bringen und zu Wachstumsstörungen
- 20 führen. So kann z.B. eine entartete Zelle zu einem Krebsgeschwür heranwachsen und über die Bildung von Metastasen den totbringenden Tumor über den gesamten Körper verteilen. Auch Viren wie HIV (Human Immunodeficiency Virus) oder HPV (Human Papilloma Virus) greifen in die natürlichen
- 25 Abläufe der Zelle ein und mißbrauchen sie dazu, sich zu vervielfältigen um dann weitere Zellen zu infizieren.

- Es ist offensichtlich, daß über solche Wechselwirkungen gezielt in das Geschehen einer Zelle eingegriffen werden
- 30 kann, sofern die entsprechenden Proteine bekannt und einem einfachen Test zugänglich sind. In den vergangenen Jahren sind derartige Tests entwickelt worden. Sie beruhen letztlich darauf, daß eine einfache biochemische Reaktion, die durch eine Farbreaktion nachweisbar und vieltausendfach
- 35 gleichzeitig durchführbar ist, von einer solchen Wechselwirkung zwischen Proteinen abhängig gemacht wird. Sogenannte in vivo Assays lassen diese Wechselwirkungen z.B.

in Hefezellen nachweisen, die leicht zu züchten und auch für die Bildung menschlicher Proteine geeignet sind (Brent, R. et al., PCT-Veröffentlichung WO 92/05286; Fields, S. et al., U.S. 5,283,173).

5

Die Transkription proteinkodierender Gene wird von einem Multiproteinkomplex bestehend aus Pol II und einer Reihe spezifischer und genereller Transkriptionsfaktoren initiiert. Eine Vielzahl dieser Faktoren ist in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert worden, wodurch man erste Einblicke in die Mechanismen der eukaryontischen Genexpression erhalten hat (Zawel et al., Curr. Opin. Cell. Biol. (1992) 4, S. 488-495; Cortes et al., Mol. Cell. Biol. (1992) 12, S. 413-421; Flores et al., J. Biol. Chem. (1992) 267, S. 2786-2793).

15

Neben der basalen Transkriptionsmaschinerie spielen vor allem die DNA bindenden Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der stimulierten Genexpression.

20

Die drei charakteristischen Merkmale von Transkriptionsaktivatoren, wie proto-Onkogene oder virale Transkriptionsfaktoren und Protein-Protein-Wechselwirkungen in Signalketten oder Multiproteinkomplexen, welche sie zu besonders geeigneten Targets für Untersuchungen machen, sind ihre hohe Diversität, ihre Spezifität sowie Ihre mögliche Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. So sind z.B. mehr als 300 genspezifische Transkriptionsfaktoren bis heute beschrieben und es wird angenommen, daß ca. 3000 weitere derartige Faktoren vom menschlichen Genom kodiert werden. Ähnlich wie Rezeptoren an der Zelloberfläche gleicht praktisch kein Faktor und keine Protein-Protein Wechselwirkung genau der anderen. Jedes Protein bietet eine einzigartige Oberfläche und stellt dadurch ein einzigartiges Target dar.

30

35

Die DNA-bindende und die stimulierende Aktivität müssen jedoch nicht auf einer Polypeptidkette lokalisiert vorliegen (Weston et al., Cell (1989) 58, S. 85-93). Die Teilung dieser beiden Eigenschaften erlaubt zum Beispiel die Untersuchung  
5 einer Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen X und Y, wobei der DNA-bindende Teil auf einem Protein X und der transkriptionsaktive Teil auf einem Protein Y lokalisiert sind (Fields et al., Nature (1989) 340, S. 245-246). Die spezifische Inhibierung dieser Interaktion resultiert im  
10 Verlust der stimulierenden Aktivität dieses Elements.

Bisher sind Verfahren bekannt, um Inhibitoren nachzuweisen, welche die biologische Aktivität von Oncoproteinen hemmen (WO 92/05286). Diese Verfahren werden eingesetzt, um  
15 inhibitorische Komponenten zu identifizieren und klassifizieren, indem die Fähigkeit einer solchen Komponente untersucht wird, die Expression von Reportergenen zu beeinflussen. Nach der vorgenannten PCT-Veröffentlichung werden zur Durchführung dieses Verfahrens Fusionsgene  
20 bereitgestellt, welche für Fusionsproteine codieren. Diese Fusionsproteine binden an eine Bindestelle auf der DNA, wobei diese DNA für die Reportergene codiert, und vermitteln so die Expression des Reportergens. Wird die Expression des Reportergens untersucht, so ist eine Abnahme der Reportergen-  
25 Expression indikativ für eine Komponente, welche die Aktivität der Fusionsproteine hemmt.

Der Nachweis von Inhibitoren erfolgt bei Anwendung der genannten Verfahren ausschließlich über eine Abnahme der  
30 Expression der betreffenden Reportergene, d.h. es handelt sich um einen Negativnachweis. Das bekannte Nachweissystem ist insofern von Nachteil, da es gegebenenfalls die Empfindlichkeit eines Testsystems herabsetzt. Wird z.B. ein Reportergen prinzipiell nur schwach exprimiert, so sind nach  
35 Inhibitorzugabe und somit noch weiter abnehmender Expression häufig keine eindeutigen Aussagen möglich. Diese Nachteile

gehen darauf zurück, daß eine zugesetzte inhibitorische Komponente einen Transkriptionsfaktor hemmt, der die Expression von Reportergenen beeinflusst, d.h. es handelt sich um eine direkte funktionelle Verbindung von Inhibitor und Reportergen. Insbesondere ist eine fehlende Expression nach Inhibitorzugabe von Nachteil, da Versuchsdurchführungen häufig auf Selektion von Organismen beruhen, wie im folgenden kurz erläutert. Wird so z.B. das Wachstum von Zellen nach Inhibitorzugabe untersucht, wachsen gerade die zu untersuchenden gehemmten Zellen nicht und müssen über weitere Versuche nachgewiesen werden. Ein Screening vieler verschiedener potentieller Inhibitoren ist daher nicht möglich. Die fehlende Expression von Reportergen nach Inhibitorzugabe kann darüber hinaus auch auf die Einflußnahme weiterer Faktoren zurückzuführen sein, beispielsweise des Inhibitors auf Faktoren der Translations- und Replikationsmechanismen sowie des Zellzyclus. Somit ist der Wirkungsort des Inhibitors häufig nicht klar zu definieren, woraus eine mangelnde Spezifität der bisherigen Nachweissysteme resultiert.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die vorgenannten Nachteile nicht aufweist, das schnelle, eindeutige und spezifische Aussagen über Testergebnisse ermöglicht sowie die Empfindlichkeit von Testsystemen verbessert.

Die Erfindung löst diese Aufgabe durch das im unabhängigen Patentanspruch 1 angegebene Verfahren und die Verwendung nach Patentanspruch 63. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen, Aspekte und Details des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den abhängigen Patentansprüchen 2 bis 62 sowie 64 und 65, den Zeichnungen, Tabellen und den bevorzugten Ausführungsformen dargelegt. Die vorliegende Erfindung stellt ein wesentlich verbessertes Nachweissystem für die Aktivität eines regulatorischen Faktors zur Verfügung. Mit dem angegebenen

Verfahren kann auch im lebenden Organismus eine inhibitorische Komponente durch Expression bzw. verstärkte Expression eines Reportersystems nachgewiesen werden, ohne daß die Nachteile bekannter Verfahren auftreten.

5

Damit wird die Empfindlichkeit des Testsystems entscheidend erhöht und ermöglicht das Screenen von Inhibitorbibliotheken großer Komplexität (über  $10^9$  verschiedene Moleküle).

10 Hiermit wird ein neues Prinzip zum Screenen nach Inhibitoren und Chemikalien, die entsprechende Aktivitäten modifizieren, eingesetzt. Der Assay kann auch zur Identifizierung bislang unbekannter Wechselwirkungen verwendet werden.

15 Wesentlich für das erfindungsgemäße Verfahren ist das Bereitstellen mindestens eines zweiten regulatorischen Faktors. Das im folgenden beschriebene Verfahren wird bevorzugt in Wirtsorganismen durchgeführt, wodurch jedoch nicht ausgeschlossen werden soll, entsprechende Verfahren  
20 auch außerhalb eines Organismus durchzuführen. Als Wirtsorganismen werden Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, oder eukaryotische Zellen, insbesondere Hefen, eingesetzt. Besonders bevorzugt sind der Bakterienstamm *Escherichia coli* oder der Hefestamm *Saccharomyces cerevisia*.

25

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden, wie vorstehend erwähnt, bevorzugt in einem Wirtsorganismus, mindestens ein Reportersystem mit mindestens einer ersten Genanordnung, welche mindestens ein Reportergen aufweist, bereitgestellt.

30 Die Expression der Reportergene dient als Nachweissystem.

Des weiteren wird mindestens ein erster regulatorischer Faktor bzw. die entsprechende Genanordnung bereitgestellt. Gemäß der vorliegenden Erfindung beeinflusst der mindestens  
35 eine erste regulatorische Faktor einen oder mehrere zweite regulatorische Faktoren und nicht direkt die Aktivität des

Reportersystems, wodurch es erstmals ermöglicht wird, die Aktivität eines ersten regulatorischen Faktors durch ein positives Signal nachzuweisen.

- 5 Der mindestens eine zweite regulatorische Faktor wird durch mindestens eine zweite Genanordnung codiert. Aus Gründen der Vereinfachung wird bei den bereits erwähnten und den im folgenden genannten, am Verfahren beteiligten Komponenten nicht immer ausdrücklich erwähnt, daß sowohl eine als auch  
10 mehrere Komponenten wie Gene, Genanordnungen, regulatorische Faktoren, Proteine usw., beteiligt sein können. Es soll jedoch so ausgelegt werden, daß diese Möglichkeiten eingeschlossen sind. Bevorzugt wird die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors durch den ersten regulatorischen  
15 Faktor beeinflußt. Über eine Wechselwirkung des zweiten regulatorischen Faktors mit Komponenten des Reportersystems wird auch Einfluß auf die Aktivität des Reportersystems genommen. Somit wird gemäß der vorliegenden Erfindung die Aktivierung des Reportersystems durch Zugabe einer  
20 inhibitorischen Komponente über das Zusammenwirken der ersten und zweiten regulatorischen Faktoren nachgewiesen.

- Der erste regulatorische Faktor enthält eine oder mehrere regulierende Komponenten. Enthält der erste regulatorische  
25 Faktor mehrere regulierende Komponenten, ist insbesondere die zusammengesetzte Form die aktive Form. Bei den ein oder mehreren regulierenden Komponenten handelt es sich häufig um ein oder mehrere regulierende Proteine. Die regulierenden Proteine sind bevorzugt ein oder mehrere  
30 Transkriptionsregulatoren, beispielsweise Transkriptionsfaktoren. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Transkriptionsfaktor nur ein Protein.

- Gemäß einer weiteren, bevorzugten Ausgestaltung des  
35 erfindungsgemäßen Verfahrens enthält der Transkriptionsregulator mindestens zwei Hybridproteine,



insbesondere zwei Hybridproteine, welche von einer bereitgestellten dritten Genanordnung codiert werden.

5 Die Hybridproteine sind bevorzugt ein erstes Hybridprotein, welches ein Fusionsprotein aus einer DNA-Bindedomäne und einer ersten Proteinkomponente ist, und ein zweites Hybridprotein, welches ein Fusionsprotein aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist. Durch Bindung zwischen den  
10 beiden Proteinkomponenten, die auch Targets genannt werden, entsteht der aktive Transkriptionsregulator.

Die regulierenden Komponenten des ersten regulatorischen Faktors sind gemäß dem vorliegenden Verfahren nicht auf  
15 regulierende Proteine beschränkt. So kann beispielsweise der erste regulatorische Faktor Nucleinsäuren oder auch weitere Komponenten enthalten.

Die Aktivität des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors wird durch inhibitorische Komponenten beeinflusst. Diese inhibitorischen Komponenten sind bevorzugt Naturstoffe wie Peptide, Nucleinsäuren und Kohlenhydrate oder  
20 niedermolekulare Substanzen oder andere chemische Substanzen oder auch durch Mutagenese veränderte Bestandteile des ersten regulatorischen Faktors.  
25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine vierte Genanordnung für die Expression von Peptiden bereitgestellt. Diese Peptide weisen insbesondere eine  
30 inhibitorische Aktivität auf. So können in vivo synthetisierte Peptidlibraries zur Inhibierung von regulatorischen Faktoren eingesetzt werden. In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen werden beliebige Kombinationen der genannten Inhibitoren zugesetzt.  
35

Besonders wichtig ist die Einwirkung der inhibitorischen Komponenten auf die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors durch Einwirkung auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei regulatorischen Komponenten, die in dem ersten regulatorischen Faktor enthalten sind. Diese Einwirkung ist bevorzugt eine Hemmung der Wechselwirkung der regulatorischen Komponenten. Die Aktivität kann auch aufgrund mehrerer Komponenten, z.B. in einem Multiproteinkomplex, reguliert werden. Dieser Komplex ist solange aktiv, wie einzelne oder mehrere Bausteine diesen Komplex bilden. Erst die Inhibierung einer oder mehrerer dieser Komponenten zerstört die Aktivität des gesamten Komplexes. Auch vom bisher Beschriebenen abweichende Aktivitäten, die in irgendeiner Weise die Expression des zweiten regulatorischen Faktors aktivieren, sind als erster regulatorischer Faktor geeignet. Die Inhibierung des ersten regulatorischen Faktors kann sowohl die Aktivität des Transkriptionsregulators und/oder die Generierung des Transkriptionsregulators betreffen. Insbesondere wird die Wechselwirkung zwischen zwei regulierenden Proteinen des ersten regulatorischen Faktors gehemmt. Wird eine der genannten Wechselwirkungen gehemmt, liegt ein inaktiver oder in seiner Aktivität herabgesetzter erster regulatorischer Faktor vor. Infolgedessen ist die Interaktion des ersten regulatorischen Faktors mit dem zweiten regulatorischen Faktor gehemmt oder herabgesetzt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Wechselwirkung zwischen dem ersten regulatorischen Faktor und dem zweiten regulatorischen Faktor beeinflusst. Auch diese Einwirkung ist besonders bevorzugt eine Hemmung. In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform beeinflusst der Inhibitor die Wechselwirkung des ersten regulatorischen Faktors mit Genabschnitten der zweiten Genanordnung. In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens modifiziert der mindestens eine erste regulatorische Faktor, der bevorzugt ein oder mehrere Proteine enthält, den mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor,

beispielsweise über Kinasierung, Dephosphorylierung, Spaltung, Umfaltung oder Konformationsänderung.

5 Wird kein Inhibitor zugesetzt, liegt der erste regulatorische Faktor insbesondere in der aktiven Form vor und wirkt auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors ein. Es ist des weiteren bevorzugt, daß der erste regulatorische Faktor mit DNA-Abschnitten der für den zweiten regulatorischen Faktor codierenden zweiten Genanordnung wechselwirkt und somit die  
10 Expression des zweiten regulatorischen Faktors beeinflusst.

Die Zugabe einer inhibitorischen Komponente beeinflusst beispielsweise die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten, welche gemeinsam den ersten regulatorischen  
15 Faktor bilden. In einer weiteren Ausführungsform wirkt die Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors ein, unabhängig davon, ob er eine oder mehrere regulierende Komponenten enthält. Die Einwirkung auf die Aktivität betrifft beispielsweise die  
20 transkriptionsaktivierende oder bindende Aktivität des ersten regulatorischen Faktors oder die Interaktion des ersten und zweiten regulatorischen Faktors.

In einer weiteren Ausführungsform beeinflusst die Zugabe einer  
25 inhibitorischen Komponente sowohl die genannte Wechselwirkung als auch die genannte Aktivität. Die Einwirkung ist bevorzugt eine Hemmung der Wechselwirkung und/oder der Aktivität.

Durch Zugabe der inhibitorischen Komponente wird bevorzugt  
30 die Wechselwirkung zwischen dem ersten regulatorischen Faktor und einem DNA-Abschnitt der zweiten Genanordnung, welche den zweiten regulatorischen Faktor codiert, wobei es sich insbesondere um eine Hemmung handelt, beeinflusst. Die Einwirkung bzw. die Hemmung der oben genannten  
35 Wechselwirkungen durch inhibitorische Komponenten führt zu einer Einwirkung auf die Genexpression der zweiten

Genanordnung, insbesondere zu einer Hemmung der Genexpression der zweiten Genanordnung. Besonders bevorzugt führt die Zugabe der inhibitorischen Komponente über eine Hemmung der Aktivität des regulierenden Proteins zu einer Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird durch die Zugabe einer inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten eingewirkt, wobei eine dieser Komponenten eine regulatorische Komponente ist oder eine regulatorische Komponente enthält.

Vorteilhaft ist, wenn diese regulatorische Komponente eine Proteinkomponente ist oder mindestens eine Proteinkomponente enthält. Bevorzugt sind bei den Proteinkomponenten Fusionsproteine.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist die regulatorische Komponente eine inhibitorische Komponente.

Die mindestens eine zweite Komponente ist beispielsweise eine Proteinkomponente oder enthält eine Proteinkomponente. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß diese Proteinkomponente ein Fusionsprotein ist.

Bei den zweiten Proteinkomponenten handelt es sich insbesondere um Proteinkomponenten, die Verankerungsfunktionen besitzen. Bevorzugt erfolgt die Verankerung der miteinander wechselwirkenden Proteinkomponenten im Cytoplasma. Als vorteilhaft hat sich auch die Verankerung der miteinander in Wechselwirkung stehenden Proteine über die Verankerungsfunktion der zweiten Proteinkomponente in der Membran erwiesen.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform erfolgt über die Zugabe einer inhibitorischen Komponente eine Hemmung der Wechselwirkung zwischen den mindestens zwei Komponenten die Freisetzung der mindestens einen ersten Komponente, welche den inhibitorisch wirksamen Abschnitt enthält. Diese freigesetzte erste Komponente interagiert mit dem transkriptionsaktivierenden Faktor der Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor. Besonders bevorzugt wird der transkriptionsaktivierende Faktor durch den freigesetzten inhibitorisch wirkenden Faktor gehemmt, wodurch eine Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung erfolgt.

In den bisher und auch im folgenden genannten Ausführungsformen enthalten die regulatorischen bzw. interagierenden Komponenten Abschnitte, die die regulatorische bzw. interagierende Funktionen bedingen. Die entsprechenden Proteinabschnitte können eine oder mehrere Abschnitte oder Domänen beinhalten. Diese Abschnitte oder Domänen können sich in verschiedenen Regionen eines Proteins bzw. auf verschiedenen Proteinen befinden.

Vorzugsweise werden die mindestens zwei Proteinkomponenten von einer fünften Genanordnung codiert.

Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente einen Abschnitt, der mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente wechselwirkt, einen Abschnitt, der mit einem Transkriptionsfaktor wechselwirkt sowie einen inhibitorischen Abschnitt enthält, wobei erst nach Hemmung der Wechselwirkung der Bindung zwischen den mindestens zwei Proteinkomponenten die inhibitorisch wirkende zweite Proteinkomponente die Expression des zweiten regulatorischen Faktors hemmt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist die mindestens eine erste regulatorische Komponente ein

Transkriptionsregulator oder Transkriptionsfaktor des zweiten regulatorischen Faktors, der nach Inhibierung der Wechselwirkung mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente in seiner Aktivität reduziert oder inaktiviert wird, wodurch eine Inhibierung oder Reduzierung der Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors erfolgt.

Bei den zweiten regulatorischen Faktoren handelt es sich insbesondere um Proteine, beispielsweise, je nach Versuchsanordnung, um mindestens einen Repressor oder um mindestens eine Rekombinase. Die aktiven zweiten regulatorischen Faktoren wirken über eine Wechselwirkung mit Komponenten des Reportersystems auf die Aktivität des Reportersystems ein. Der zweite regulatorische Faktor bindet bevorzugt an DNA-Abschnitte des Reportersystems.

Ein Repressor, codiert durch die zweite Genanordnung, ist ein Beispiel für einen zweiten regulatorischen Faktor. Dieser Repressor beeinflusst die Expression mindestens eines Reportergens, indem er bevorzugt an Komponenten des Reportersystems bindet. Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Bindung des Repressors an Komponenten des Reportersystems durch weitere Agenzien reguliert. So induziert beispielsweise das Antibiotikum Tetrazyklin eine Ablösung eines prokaryotischen Repressors von der DNA. Ein aktiver Repressor hemmt die Expression mindestens eines Reportergens. Wird dagegen, zum Beispiel durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression des Repressorgens gehemmt, erfolgt die Expression mindestens eines Reportergens.

Eine Rekombinase, codiert durch die zweite Genanordnung, ist ein weiteres Beispiel für einen zweiten regulatorischen Faktor. In einer entsprechenden Versuchsanordnung enthalten die Reportersysteme Rekombinationselemente. Liegt ein aktiver

erster regulatorischer Faktor vor, eliminiert oder invertiert die Rekombinase über Rekombinationsprozesse mindestens ein Reportergergen. Hierbei interagiert die Rekombinase mit den spezifischen, das Reportergergen bzw. die Reportergergene flankierende Rekombinationselemente und eliminiert oder invertiert das Reportergergen, welches von den Rekombinationselementen flankiert wird. Sowohl nach einer Elimination als auch nach Invertierung wird das Reportergergen nicht exprimiert. Ist also kein Inhibitor dem Versuchsansatz zugesetzt worden, liegt ein aktiver erster regulatorischer Faktor vor, der bevorzugt die für einen zweiten regulatorischen Faktor codierenden Gene aktiviert, insbesondere über Wechselwirkung mit DNA-Abschnitten. Der zweite aktive Faktor, wie z.B. ein Repressor oder eine Rekombinase, hemmt die Expression der Reportergergene.

Durch die Beeinflussung der Wechselwirkung von mindestens zwei regulatorischen Komponenten des Transkriptionsregulators, wobei die regulatorischen Komponenten insbesondere zwei Hybridproteine sind, wird in einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergergens erfolgt. Durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators (bzw. anderer regulatorischer Faktoren des Transkriptionsregulators) wird die Expression der Rekombinase insbesondere gehemmt und es erfolgt eine Expression des mindestens einen Reportergergens.

Besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform, bei der durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens eines Repressorgergens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergergens erfolgt.

Insbesondere wird durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression des Repressor-Gens gehemmt und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

5

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.

10

Besonders bevorzugt wird durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression der Rekombinase gehemmt und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

15

Die Versuche basieren darauf, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen mindestens ein Genprodukt des mindestens einen Reportergens nachweisbar ist.

20

Gemäß bevorzugter Ausführungsformen wird ein Genprodukt eines Reportergens oder werden mehrere Genprodukte mehrerer Reportergene exprimiert. In einer weiteren Ausgestaltung werden je nach variierenden Versuchsbedingungen ein bis mehrere Reportergene exprimiert.

25

Der Nachweis des Genprodukts bzw. der Genprodukte erfolgt dann beispielsweise über eine oder mehrere Veränderungen des Phänotyps von Wirtszellen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das Genprodukt des Reportergens Zellwachstum der Wirtszellen in Mangelmedium. Das Genprodukt z.B. des Reportergens Leu2 ermöglicht Zellwachstum in Leucin-defizientem Medium. Bei einer weiteren vorteilhaften Abwandlung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Hefestämme mit chromosomalen Mutationen als Wirtszellen eingesetzt, die beispielsweise zu Leucin-Defizienzen bei der Verstoffwechselung der Aminosäure Leucin führen. Die

30

35



chromosomalen Mutationen können auch zu Defizienzen bei der Verstoffwechselung der Aminosäuren Tryptophan und Histidin führen. Gegebenenfalls ist auch der Einsatz proteasedefizienter Hefen sinnvoll.

5

Es ist auch bevorzugt, Genanordnungen bereitzustellen, die für ein oder mehrere Genprodukte codieren, wobei diese Genprodukte Substrate in einer meßbaren Farbreaktion umsetzen können, wie z.B. das Reportersystem LacZ. Das Genprodukt dieses Reportergens, die  $\beta$ -Galactosidase, reagiert mit verschiedenen Substraten in einer sichtbaren Farbreaktion.

10

Die für das vorliegende Verfahren genannten Genanordnungen können auf verschiedenen Vektoren oder demselben Vektor angeordnet sein. Als Vektoren werden insbesondere Plasmide verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind ein oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Genanordnungen, oder eine oder mehrere Genanordnungen, ins Wirtsgenom integriert.

15

20

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird also durch Einsatz einer oder mehrerer inhibitorischer Komponenten zunächst die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors beeinflusst, wobei dieser wiederum auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors einwirkt.

25

Der zweite regulatorische Faktor wirkt schließlich auf die Expression des Reportergens ein. Bevorzugt wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch Zusatz ein oder mehrerer inhibitorischer Komponenten die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors gehemmt, dadurch bedingt wird ebenfalls der zweite regulatorische Faktor gehemmt, wobei gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der zweite regulatorische Faktor selbst gehemmt oder in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die Expression des zweiten regulatorischen Faktors gehemmt wird. Da in keinem Fall ein

30

35

aktiver zweiter regulatorischer Faktor vorliegt, wird das Reporter-Gen bzw. werden die Reporter-Gene exprimiert. Erst die Inhibierung des ersten regulatorischen Faktors bewirkt also eine Expression von Reporter-Genen. Der jeweilige Phänotyp hängt davon ab, ob der zweite regulatorische Faktor gebildet wird oder nicht. Besonders hervorgehoben werden soll eine weitere Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, wobei in einem Wirtsorganismus zwei Genanordnungen für zwei zweite regulatorische Faktoren, insbesondere Genanordnungen für einen Repressor und eine Rekombinase, neben den in z.B. Anspruch 1 erwähnten übrigen zur Versuchsdurchführung notwendigen Genanordnungen, bereitgestellt werden.

Je nach Versuchsbedingung wird einer der beiden zweiten regulatorischen Faktoren, d.h. insbesondere Repressor oder Rekombinase, oder werden auch beide gleichzeitig exprimiert. Hierdurch bedingt wird eine erhöhte Spezifität des Verfahrens erreicht.

Die Inhibierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors bzw. des Transkriptionsregulators oder dessen Generierung führt schließlich zur Aktivierung des Reporter-Genes bzw. der Reporter-Gene.

Gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist es möglich, hochspezifische Inhibitoren nachzuweisen, sowie Selektivität und Spezifität des Nachweises von Inhibitoren zu erhöhen. Mit dem vorliegenden Verfahren sind so z.B. bei Wachstumsversuchen selektiv die Zellen nachweisbar, auf die der Inhibitor eingewirkt hat, während die "nicht gehemmten" Zellen nicht wachsen, d.h. es ergeben sich keine Probleme wie Überwachsen der interessierenden Zellen. Damit wird die Empfindlichkeit des Testsystems entscheidend erhöht und ermöglicht das Screenen von Inhibitorbibliotheken großer Komplexität (über  $10^9$  verschiedene Moleküle). Somit ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren überhaupt zum ersten Mal

möglich, nach Inhibitorzugabe eine Identifikation von Zellen, insbesondere auch aufgrund von Wachstum, durchzuführen. Dies erweist sich als sehr vorteilhaft, wenn z.B. ein sehr ungünstiges Verhältnis von Zellen, auf die der Inhibitor einwirkt (meist sehr geringer Anteil), zu Zellen, auf die der Inhibitor nicht einwirkt, vorliegt. Des weiteren ist es möglich, Aussagen bezüglich des spezifischen Wirkungsortes des Inhibitors zu machen, da gezielt auf z.B. regulatorische Faktoren eingewirkt wird und erst nach Hemmung des Faktors die Reportergene exprimiert werden. So ermöglicht das Verfahren, Signalketten und andere Regulationsmechanismen zu untersuchen und bietet Voraussetzungen für eine spezifische Arzneimittelentwicklung. Das Verfahren dient zur Auffindung von Leitstrukturen, die bevorzugt zur Entwicklung von Therapeutika eingesetzt werden. Des weiteren wird das Verfahren bevorzugt zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die beispielsweise als Leitstrukturen einsetzbar sind, verwendet. Diese inhibierenden Substanzen sind beispielsweise Peptide, Naturstoffe und synthetische Chemikalien. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Inhibierung des ersten regulatorischen Faktors in vivo synthetisierte Peptidlibraries bereitgestellt.

Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt, wobei die Ausführung jeweils unter Berücksichtigung eines aktiven bzw. inaktiven ersten regulatorischen Faktors erläutert wird. Ausgegangen wird bei den Ausführungen von Proteinen als regulatorische Faktoren.

Als Reportergen dienen z.B. das Leu2-Gen, welches Wachstum auf Leucin-defizientem Medium ermöglicht, und das LacZ-Gen, dessen Genprodukt, die  $\beta$ -Galactosidase, verschiedene Substrate in einer sichtbaren Farbreaktion umsetzt (X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) ergibt Blaufärbung, ONPG (o-Nitro-phenyl-galactopyranosid) ergibt

Gelbfärbung). Entsprechend analog zu Leu2 können auch andere Gene, welche Enzyme aus der Biosynthese codieren, wie z.B. das Gen URA3, eingesetzt werden, da seine Expression entsprechend defiziente Hefestämme komplementieren und damit Wachstum auf Uracil defizienten Medien ermöglichen kann (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986)). Auch die Aktivität von Luciferase oder Chloramphenikol-Acetyltransferase kann leicht und schnell in enzymatischen Reaktionen nachgewiesen werden (Ibelgauf, Gentechnologie von A bis Z (1990) VCH-Verlag (Weinheim)).

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der beiliegenden Zeichnungen näher erläutert.

Fig. 1a und 1b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 1a) und eines inaktiven (Fig. 1b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 2a und 2b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 2a) und eines inaktiven (Fig. 2b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 3a und 3b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 3a) und eines inaktiven (Fig. 3b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

- Fig. 4a und 4b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 4a) und eines inaktiven (Fig. 4b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.
- Fig. 5a und 5b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 5a) und eines inaktiven (Fig. 5b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.
- Fig. 6a und 6b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 6a) und eines inaktiven (Fig. 6b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.
- Fig. 7a und 7b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 7a) und eines inaktiven (Fig. 7b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.
- Fig. 8a und 8b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 8a) und eines inaktiven (Fig. 8b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

- Fig. 9a und 9b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor LexA-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 9a) und eines inaktiven (Fig. 9b) ersten regulatorischen Faktors AD1-Tet mit der DNA dargestellt wird.
- Fig. 10a und 10b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 10a) und eines inaktiven (Fig. 10b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF7 mit der DNA dargestellt wird.
- Fig. 11a und 11b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 11a) und eines inaktiven (Fig. 11b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2 - AD1-TIM mit der DNA dargestellt ist.

Bei den in den Fig. 1 und 3 genannten Targets (Zielen) bzw. transkriptionsstimulierenden Targets handelt es sich um regulatorische Faktoren, insbesondere um Transkriptionsfaktoren für die Expression der zweiten regulatorischen Faktoren, auf die der Inhibitor einwirkt. Die regulatorischen Faktoren sind in den in den Figuren gezeigten Beispielen ein Repressor bzw. eine Rekombinase.

Bei den in den Fig. 2 und 4 genannten Targets (Zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden regulatorischen Komponenten des regulatorischen Faktors, wobei Target I die regulatorische Komponente mit der

bindenden Aktivität und Target II die regulatorische Komponente mit der transkriptionsaktivierenden Aktivität ist.

Bei den in den Fig. 5 und 6 genannten Targets (Zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden Komponenten des ersten regulatorischen Faktors, wobei Target I die regulatorische Komponente mit sowohl der DNA bindenden als auch der transkriptionsaktivierenden Aktivität und Target II die Komponente ist, mit der Target I wechselwirkt und ausschließlich bei ungestörter Wechselwirkung in der aktiven Form vorliegt.

Bei den in den Fig. 7 und 8 genannten Targets (Zielen) handelt es sich um miteinander interagierende Komponenten, wobei Target II die regulatorische Komponente mit sowohl einer inhibierenden Aktivität als auch einer bindenden Aktivität, und Target III eine verankerte Komponente ist.

Die bindende Aktivität des Target II bezieht sich auf die Wechselwirkung des von Target III gelösten Targets II mit der X-Komponente von Target I. Die X-Komponente von Target I wiederum ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor des zweiten regulatorischen Faktors.

Mit der Bezeichnung Aktivität werden insbesondere Proteinabschnitte bezeichnet, die die jeweilige Aktivität bzw. die betreffende Funktion bewirken. Hierbei können eine oder mehrere Domänen betroffen sein. Die Domänen bzw. Proteinabschnitte können in verschiedenen Bereichen eines Proteins oder auf verschiedenen Proteinen lokalisiert sein.

Entsprechend sind die Bindestellen dieser Faktoren als Target-Bindestellen bezeichnet.

In den Beispielen 1 bis 11 wurde wie folgt vorgegangen:

Hefe-Plasmide

Zur Expression der verschiedenen Gene in dem zugrundeliegenden Assay werden sowohl kommerziell erhältliche Plasmide (z.B. pYES2 der Firma Invitrogen, Niederlande), als auch andere Konstrukte (Altmann, H. Dissertation (1994), Altmann H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1994) 91, S. 3901-3905) eingesetzt. Normalerweise besitzen diese Plasmide einen Replikationsursprungsort zur Vervielfältigung ihrer DNA in Hefen (z.B. "2µm-ori") sowie einen zur Replikation in Bakterien (z.B. "colE1-Ori"). Desweiteren werden Markergene zur Selektion dieser Plasmide in den beiden Organismen verwendet (z.B. URA3, HIS3, TRP1 oder LEU2 in Hefe sowie Amp<sup>r</sup> oder Tetr in E. coli) (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986); Ibelgauf, G. Gentechnologie von A bis Z (1990) VCH-Verlag (Weinheim)). Beispiele für Hefevektoren sind beschrieben (Winnacker et al., From Genes to Clones (1987) VCH-Verlag (Weinheim); The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (1991) Vol. 1 und 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Die Expression von Genen kann über konstitutive (z.B. ADHI-Promotor), induzierbare (z.B. Gal-Promotor) oder eigens konstruierte Target-abhängige Promotoren (NFI, Tet, LexA) erfolgen.

Anstelle in Plasmide kloniert können die einzelnen Elemente des Assays auch in das Genom des verwendeten Hefestammes integriert werden (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986)). Derartig in der Hefe lokalisierte Elemente benötigen keinen eigenen Replikationsursprungsort sowie Selektionsmarker.

Folgende Elemente werden im Testsystem verwendet:



## a) Promotoren:

5        ADHI-Promoter: Dieser konstitutiv expremierende Promotor wird über die Restriktion mit den Enzymen BamHI und HindIII funktionell aus dem Plasmid pAAH5 isoliert (Ammerer et al., Methods in Enzymology (1983) Academic Press, S. 192-201).

10       Gall-Promoter: Dieser auf Glukose-haltigen Medien reprimierbare und auf Galaktose-haltigen Medien induzierbare Promotor wird mit Hilfe des Restriktionsenzymys SpeI aus dem Vektor pYES2 der Firma Invitrogen (Niederlande) isoliert.

15       inaktiver Gall/Gall10-Promoter: Dieser ursprünglich über Galaktose induzierbare Promotor wird auf Sequenzebene derart deletiert, daß er in Hefe nur mehr basale Aktivität besitzt (Yocum et al., Mol. Cell. Biol. (1984) 4, S. 1985-1998; West et al., Mol. Cell. Biol. (1984) 4, S. 2467-2478). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI und HindIII wird dieses Promotorelement aus dem so  
20       konstruierten Vektor pLR1Δ1 isoliert und für weitere Zwecke verwendet.

25       NFI-abhängiger Promoter: Die von Meisterernst et al. (Nucl. Acid Res. (1988) 236, S. 27-32) gefundene Konsensussequenz als DNA-Bindungsstelle für Mitglieder der NFI-Familie (Nuklear Faktor I) wird als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von  
30       NFI-abhängigen Promotoren verwendet (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, S. 3901-3905).

Sequenz für 6 NFI-Bindestellen konstruiert aus zwei Oligonukleotiden:

## 1. Oligo:

5'- TCG AGT TTT TGG CAC TGT GCC AAT TCT TTT TGG CAC TGT GCC AAT TCT  
 3'- CA AAA ACC GTG ACA CGG TTA AGA AAA ACC GTG ACA CGG TTA AGA  
 TTT TGG CAC TGT GCC AAT TC - 3'  
 5 AAA ACC GTG ACA CGG TTA AG - 5'

## 2. Oligo:

5'- TTT TTG GCA CTG TGC CAA TTC TTT TTG GCA CTG TGC CAA TTC TTT TTG  
 3'- AAA AAC CGT GAC ACG GTT AAG AAA AAC CGT GAC ACG GTT AAG AAA AAC  
 GCA CTG TGC CAA TTC - 3'  
 CGT GAC ACG GTT AAG AGC T - 5'

Tet-abhängiger Promoter: Die von Hillen et al. (Nature (1982) 297, S. 700-702) gefundene Konsensussequenz als DNA-Bindungsstelle für den Tet-Repressor wird als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von Tet-abhängigen Promotoren verwendet.

Sequenz für die Tet-Operator-Bindestelle O<sub>1</sub>/O<sub>2</sub>:

5'- TCG ATC TCT ATC ACT GAT AGG GAG TGG TAA AAT AAC TCT ATC AAT GAT  
 3'- AG AGA TAG TGA CTA TCC CTC ACC ATT TTA TTG AGA TAG TTA CTA  
 AGA - 3'  
 TCT CAG A- 5'

LexA-abhängiger Promoter: Die DNA-Konsensussequenz als Bindungsstelle für den bakteriellen Repressor LexA wurde als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von LexA-abhängigen Promotoren verwendet (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, S. 3901-3905; Wendler et al., Nuc. Acid Res. (1994) 22, S. 2601-2603; Brent et al., Cell (1985) 43, S. 729-736). Um die reprimierende Aktivität von LexA-Fusionen auf den Galaktose-induzierten Gall-Promotor nachzuweisen, wird mit Hilfe des Restriktionsenzymys BamHI dieser Promotor aus dem Plasmid JK101 (Golemis et al., Mol. Cell. Biol.

(1992) 12, S. 3006-3014) isoliert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

5        loxP-abhängiger Promoter: Die von Hoess et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, S. 3398-3402) beschriebenen loxP-Elemente, welche es der Rekombinase Cre des Coliphagen P1 ermöglichen zwischen zwei derartigen Elementen liegende Sequenzen zu deletieren oder zu invertieren werden als Oligonukleotid  
10        synthetisiert und für die Konstruktion von Cre-abhängigen Promotoren verwendet.

Sequenz für das loxP-Rekombinase Element:

15        5'- GAG ATC ATA TTC AAT AAC CCT TAA TAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA  
         3'- CTC TAG TAT AAG TTA TTG GGA ATT ATA TTG AAG CAT ATT ACA TAC GAT  
         TAC GAA GTT ATT AGG TCG        - 3'  
         ATG CTT CAA TAA TCC AGC AGC T - 5'

20        b) Reportergene.

25        LacZ-Gen: Das LacZ-Gen wird über die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII aus dem Plasmid pMC1871 (Casadaban et al., J. Meth. in Enzy. 100, (1983) 100, S. 293-308) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

30        Leu2-Gen: Das Leu2-Gen wird mittels PCR-Reaktion aus dem Plasmid pAAH5 (Ammerer, Methods in Enzymology (1983), S. 192-201, Academic Press) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

eingesetzte Sequenzprimer:

35        Leu1:     5'- CGC GGA TCC ATG TCT GCC CCT AAG - 3'  
         Leu1rev: 5'- GCT CTA GAT CTT TTT AAG CAA GGA TTT TC - 3'

Tet-Gen: Das Tet-Gen wird mittels der Restriktionsenzyme XbaI und BstEII aus dem Plasmid pWH1950, ein Derivat des Plasmides pRT240 (Wissmann et al., Genetics (1991) 128, S. 225-232) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

Crel-Gen: Das Crel-Gen wird mittels PCR-Reaktion aus dem Coliphagen P1 (Hoess et al., J. Mol. Biol. (1985) 181, S. 351-363) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

eingesetzte Sequenzprimer:

Crel: 5'- GGG GTA CCT ATG TCC AAT TTA CTG AC - 3'

Crelrev: 5'- GGG GTA CCG CGG CCG CCT AAT CGC CAT CTT CC - 3'

#### c) Targetgene

NFI-Gene: Die verschiedenen NFI-Gene werden kloniert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt (Meisterernst et al., Nuc. Acid Res. (1988) 236, S. 27-32; Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

LexA-Gen: Das LexA-Gen wird mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI aus dem Plasmid pEG202, einem Derivat des Vektors LexA202 mit einer zusätzlichen Polylinkersequenz hinter dem LexA-Gen (Ruden et al., Nature (1991) 350, S. 250-252) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

NFkB-Gen: Die codierende Sequenz für die transkriptionsaktive Domäne TA<sub>1</sub> (Aminosäure 521-551) des Proteins NFkB wird mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoRI aus dem Plasmid pLexTA<sub>1</sub> (Schmitz et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, S. 25613-25620) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

5        TIM-Gen: Die codierende Sequenz für den C-terminalen Teil des TIM-Proteins wird mit CTF2, einem Mitglied der NFI-Familie, im sog. "interaction trap" (Current Protocols in Molecular Biology, 1994; Altmann (1994) Dissertation) isoliert.

10        GST-Gen: Die kodierende DNA-Sequenz für die 26 kDa-Domäne aus dem GST Protein (Glutathion-S-Transferase) wird mittels Restriktionsenzymen aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pGEX 3X der Firma Pharmacia (Schweden) isoliert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

15        AD1-Tet: Das Fusionsgen AD1-Tet setzt sich aus der sauren Aktivierungsdomäne AD1, isoliert aus dem Plasmid pJG4-5 (Gyuris et al., Cell (1983) 75, S. 791-803) mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI, und der kodierenden Sequenz für den Tet-Repressor (siehe oben) zusammen.

20

d) Inhibitorexpression:

25        TrxA-Gen: Das TrxA-Gen wird mittels PCR-Reaktion aus dem Plasmid pCJF7 (Lim et al., J. Bact. (1985) 163, S. 31-36) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

eingesetzte Sequenzprimer:

30        Trx1: 5'- GGA ATT CCC CGG GAT GAG CGA TAA AAT TAT TC - 3'

Trx1rev: 5'- CGG GAT CCC TCG AGT CAG CTA ATT ACC CGG GTA CCA CTT G - 3'

"Random Oligo-Pool": Zur Konstruktion eines "Random Oligo-Pools" wird ein Einzelstrangoligonukleotid-Pool folgender Zusammensetzung synthetisiert:

**Sequenz:**

5'- TAG CCG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AGA GCT CTT CCG TCT GGC TAG CNN  
BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BAG CGC TGG TCC GAA GAG CTC  
5 TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA...-3'

N bedeutet, daß an dieser Stelle alle 4 möglichen Basen (A, G, C und T) bei der Synthese zugegeben wurden (IUPAC-Nomenklatur).

B bedeutet, daß an dieser Stelle die drei Basen G, C und T bei der Synthese zugegeben wurden (IUPAC-Nomenklatur).

Mittels Klenow-Polymerase werden aus den Einzelsträngen Doppelstränge hergestellt.

Diese wurden anschließend nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym SspI in die RsrII-Schnittstelle des TrxA-Genes kloniert.

**Experimentelle Vorgehensweise**

Die Kultivierung und Transformation von Bakterien, Hefen und höheren eukaryontischen Zellen erfolgt nach Standardbedingungen (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987), John Wiley & Sons (New York); Miller, Experiments in Molecular Genetics (1972), Cold Spring Harbour, N.Y.; Sambrook et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbour Laboratory Press; Lindl et al., (1987); Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

Die Bakterienstämme JK101 der Firma Stratagene (Deutschland) und Top10 der Firma Invitrogen (Deutschland), sowie die Hefestämme INVSc1 und INVSc2 der Firma ITC (Deutschland) wurden für die Experimente eingesetzt.

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität, dem LacZ-Genprodukt, erfolgt in sogenannten  $\beta$ -Galaktosidase Assays (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

5

Zur Bestimmung der CAT-Enzym Aktivität in Proteinextrakten nach dem Immunassayprinzip wird beispielsweise der von der Firma Boehringer (Deutschland) kommerziell erhältliche "CAT-ELISA"-Test verwendet.

10

### Beispiel 1

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 1 angegebene Konfiguration dar.

15

1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für einen Transkriptionsfaktor codiert. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an DNA-Bereiche einer DNA (Target-Bindestelle), die für einen zweiten regulatorischen Faktor, in dieser Versuchsanordnung für einen Repressor, codiert.

20

2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer Bindestelle auf der DNA (Target-Bindestelle) für den unter 1 genannten Transkriptionsfaktor bereitgestellt.

25

3. Eine Reporteranordnung mit den Reportergen Leu2 und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer Transkriptionsfaktor TF) bindet, aus einer oder

30

35

mehreren Repressorerkennungssequenzen, an die ein Repressor binden kann, und einer TATA-Box für die basale Transkription zusammen.

- 5 a. Wird der Versuchsanordnung kein Inhibitor  
zugesetzt, liegt ein aktiver Transkriptionsfaktor  
vor, der die Expression eines Repressorproteins  
positiv reguliert. Der aktive Repressor bindet an  
die oben genannte Repressorerkennungssequenz bzw.  
10 Repressorbindestelle und reprimiert die Expression  
des Reportergens LacZ und/oder Leu2, d.h. es  
findet kein Wachstum der Wirtsorganismen statt,  
eine Farbreaktion ist nicht nachzuweisen.
- 15 b. Nach Zugabe eines Inhibitors wird die Aktivität  
des ersten regulatorischen Faktors, hier  
Transkriptionsfaktor, gehemmt. Dies ist auf eine  
Hemmung der Interaktion des Transkriptionsfaktors  
mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA  
20 oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne  
zurückzuführen. Es findet keine Expression des  
Repressorgens statt. Somit steht kein Repressor  
zur Verfügung, und das dem Promotor  
nachgeschaltete Reportergen LacZ und/oder Leu2  
25 wird durch einen induzierbaren endogenen  
Transkriptionsfaktor stark exprimiert.  
Infolgedessen wachsen die Hefen in Leucin-  
defizienten Medien, und nach Wachstum in X-Gal-  
haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.
- 30 Die Zugabe eines Inhibitors führt also gemäß der  
vorliegenden Erfindung zu einer Expression des  
Reportergens/der Reportergene, indem der zweite  
regulatorische Faktor, hier Repressor, gehemmt  
35 wird.



Beispiel 2

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 2 dargestellte Konfiguration dar.

5

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Hybridproteine des Transkriptionsregulators codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein Hybridprotein codiert, welches ein Fusionsprotein aus einer Bindedomäne und einer ersten Proteinkomponente ist, sowie eine weitere Anordnung für ein Hybridprotein codiert, welches ein Fusionsprotein aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist (Fig. 2a).

10

15

2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsregulator bereitgestellt.

20

3. Eine Reporterorgananordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

25

a. Der Transkriptionsregulator setzt sich, wie oben beschrieben, aus zwei Fusionsproteinen zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt (siehe Fig. 2a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsregulator ist vorhanden. Dieser aktive Transkriptionsregulator bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (Target-Bindestelle), welche für das Repressorgen codiert, und bewirkt eine Expression

30

35

des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht  
5 exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

10 b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-  
15 Wechselwirkung der Fusionsproteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsregulator oder ein in seiner Aktivität verminderter Transkriptionsregulator vor, da die  
20 Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und die DNA-Bindedomäne auf verschiedenen Fusionsproteinen lokalisiert sind und demzufolge bei einer Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine diese Domänen nicht oder vermindert  
25 miteinander wechselwirken können.

Die DNA-bindende Domäne des einen Fusionsproteins des Transkriptionsregulators kann, je nach  
30 Versuchsbedingung und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt binden oder nicht binden. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des  
35 inaktiven Transkriptionsregulators findet keine Expression des Repressorgens statt.

5 Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung  
eines entsprechenden weiteren Transkriptions-  
faktors, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ  
exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen  
auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein  
Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-  
Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der  
vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines  
10 Inhibitors über Hemmung des zweiten  
regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer  
Expression der Reportergene.

Weitere bevorzugte Ausführungen ergeben sich aus  
Abwandlungen der unter den Beispielen 1 und 2  
15 beschriebenen Ausführungsformen.

### Beispiel 3

20 Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 3 gezeigte  
Konfiguration.

- 25 1. Eine Genanordnung, welche für einen  
Transkriptionsfaktor codiert, wird bereitgestellt.  
Dieser Transkriptionsfaktor bindet an Bereiche einer  
DNA (Target-Bindestelle), die für eine Rekombinase  
codiert.
- 30 2. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt,  
welche für die sequenzspezifische Rekombinase des  
Coliphagen P1 codiert.
- 35 3. Eine Reportergenordnung mit den Reportergenen Leu2  
und/oder LacZ wird bereitgestellt, wobei beide  
Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her  
den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser  
Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein

endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

- 5 a. Wie bereits unter Beispiel 1 beschrieben, liegt, sofern kein Inhibitor zugesetzt wird, ein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression der Rekombinase Cre positiv. Die Rekombinase  
10 interagiert mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene LacZ/Leu2 flankieren und eliminiert oder invertiert in einem Rekombinationsprozeß die genannten Reportergene.
- 15 Entsprechend werden keine funktionellen Reportergene exprimiert, es findet kein Wachstum der Wirtsorganismen statt, und es ist auch keine Farbreaktion nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium nachweisbar.
- 20 b. Nach Zugabe eines Inhibitors wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors gehemmt, wobei dies auf eine Hemmung der Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der entsprechenden  
25 Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen ist. Demzufolge findet keine Expression der Rekombinase statt und die dem Promotor nachgeschalteten Reportergene LacZ und/oder Leu2 werden durch einen  
30 induzierbaren, bevorzugt endogenen Transkriptionsfaktor stark exprimiert. Die Wirtsorganismen, in dieser Versuchsanordnung sind es bevorzugt Hefen, wachsen nun auf Leucin-defizienten Medien und bei Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein  
35 Farbumschlag (Blau) auf.

Die Zugabe eines Inhibitors führt also wiederum zu einer Expression von Reportergenen.

#### Beispiel 4

5

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 4 dargestellte Konfiguration.

10

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 2 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Hybridproteine codieren, welche über eine Protein-Protein-Wechselwirkung einen aktiven Transkriptionsregulator bilden.

15

2. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen P1 codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.

20

3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen Leu2 und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reporter gene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reporter gene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

25

30

a. Wie auch unter Beispiel 2 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den den Transkriptionsfaktor bildenden Fusionsproteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsfaktor vorliegt. Der aktive Transkriptionsfaktor bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase

35

- 5                   codierende cre-Gen enthält. Nach Bindung des  
Transkriptionsfaktors wird die Cre-Rekombinase  
exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder  
invertiert über Rekombinationsprozesse das oder  
10                   die Reportergene, wobei sie mit den lox P-  
Sequenzen, welche die Reportergene flankieren,  
interagiert. Sowohl nach einer Elimination als  
auch nach einer Inversion werden keine  
funktionellen Reportergene exprimiert. Demzufolge  
15                   findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum  
auf Leucin-defizientem Medium statt, ebenso keine  
Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem  
Medium.
- 15                   b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsansatz  
wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der  
Fusionsproteine des Transkriptionsregulators  
gehemmt. Es liegt somit kein aktiver  
20                   Transkriptionsregulator vor. Die DNA-bindende  
Domäne des einen Fusionsproteins des  
Transkriptionsregulators bindet, je nach  
Versuchsbedingungen und zugesetztem Inhibitor, an  
den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht.  
25                   Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-  
Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver  
Transkriptionsregulator vor. Infolge des fehlenden  
aktiven Transkriptionsregulators bindet kein  
Transkriptionsregulator an die Bindestelle auf der  
30                   DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die  
Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert.  
Entsprechend werden die Reportergene Leu2 und/oder  
LacZ weder eliminiert noch invertiert. Eine  
fehlende Rekombinase führt somit zu einer  
35                   Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der  
Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht

wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

5                    Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-  
cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines  
Inhibitors die Expression des zweiten  
regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase,  
gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene  
10                   erst ermöglicht wird. Die Nutzung einer  
Rekombinase in dem vorliegenden Verfahren  
ermöglicht einen Inhibitornachweis nach einem  
"Alles-oder Nichts"-Prinzip, wobei sich, gemäß der  
vorliegenden Erfindung, der positive Nachweis von  
15                   Reportergenen nach Inhibitorzugabe als besonders  
geeignet erweist und sehr empfindliche Nachweise  
ermöglicht.

#### Beispiel 5

20                   Dieses Beispiel stellt die in Fig. 5 angegebene  
Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei  
wechselwirkende Proteine codieren, wobei eine  
25                   Anordnung für ein Protein codiert, welches eine DNA-  
bindende Domäne, eine Domäne, welche an ein weiteres  
zweites Protein bindet, und eine aktivierende Domäne  
enthält, sowie eine weitere Anordnung für ein  
weitere Protein, welches mindestens eine mit  
30                   dem ersten Protein wechselwirkende Domäne enthält  
(Fig. 5a).

2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit  
einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-  
35                   Bindestelle) für den Transkriptionsregulator  
bereitgestellt.

3. Eine Reportergeranordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

- 5 a. Der Transkriptionsregulator setzt sich aus den beiden oben beschriebenen Proteinen zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt (siehe Fig. 5a).  
10 Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung (Target I - Target II) statt und ein aktiver Transkriptionsregulator liegt vor. Der aktive Transkriptionsregulator bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der  
15 DNA (Target I-Bindestelle), welche für das Repressorgen codiert, und bewirkt eine Expression des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im Promotorbereich der Reporter gene und reprimiert eine Expression der  
20 Reporter gene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.
- 25 b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische  
30 Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsregulator vor, da bei einer Hemmung der Wechselwirkung der Proteine der  
35 Transkriptionsregulator nicht in der aktiven Form (Konformation) vorliegt.



Die DNA-bindende Domäne des einen Proteins des Transkriptionsregulators kann, je nach Versuchsbedingung und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt binden oder nicht binden. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsregulators findet keine Expression des Repressorgens statt.

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors TF, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

#### Beispiel 6

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 6 dargestellte Konfiguration.

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 5 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Proteine codieren, welche über eine Protein-Protein-Wechselwirkung einen aktiven Transkriptionsregulator bilden.
2. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des

Coliphagen P1 codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.

- 5           3. Eine Reporteranordnung mit den Reportergenen Leu2  
und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei  
beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom  
Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor  
besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an  
10 die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und  
eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende  
lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.
- 15           a. Wie auch unter Beispiel 5 beschrieben, findet,  
sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte  
Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den den  
Transkriptionsregulator bildenden Proteinen statt,  
womit ein aktiver Transkriptionsregulator  
vorliegt. Der aktive Transkriptionsregulator  
bindet an eine auf der DNA befindlichen  
20 Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-  
Rekombinase codierende Cre-Gen enthält. Nach  
Bindung des Transkriptionsregulator wird die Cre-  
Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase  
eliminiert oder invertiert über  
25 Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene,  
wobei sie mit den lox P-Sequenzen, welche die  
Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach  
einer Elimination als auch nach einer Inversion  
werden keine funktionellen Reportergene  
30 exprimiert. Demzufolge findet ohne Zugabe eines  
Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem  
Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei  
Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.
- 35           b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsansatz  
wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der

Proteine, z.B. über Konformationsänderung, des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsregulator vor. Die DNA-bindende Domäne des einen Proteins des Transkriptionsregulators bindet, je nach Versuchsbedingungen und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsregulators bindet kein Transkriptionsregulator an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert. Entsprechend werden die Reportergene Leu2 und/oder LacZ weder eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-Cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase, gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene erst ermöglicht wird. Die sich ergebenden Vorteile wurden bereits in Beispiel 4b beschrieben.

#### Beispiel 7

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 7 dargestellte Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Proteine Target II und Target III codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein Protein Target III codiert, welches ein Protein aus einem verankernden Abschnitt und einer ersten Proteinkomponente ist, und eine weitere Anordnung für ein Protein Target II codiert, welches ein Fusionsprotein aus einem inhibierenden Abschnitt und einer zweiten Proteinkomponente ist (Fig. 7a).
2. Es wird eine Genanordnung für einen Transkriptionsfaktor Target I bereitgestellt, der inhibiert werden kann.
3. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsfaktor bereitgestellt.
4. Eine Reporterorgananordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.
  - a. Bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine kann der inhibierende Abschnitt des ersten Proteins nicht mit dem Transkriptionsfaktor wechselwirken, somit liegt ein aktiver Transkriptionsfaktor vor (siehe Fig. 7a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsfaktor ist vorhanden. Dieser aktive Transkriptionsfaktor bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA, welche für das Repressorgen codiert, und bewirkt eine Expression des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im

Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine Target II und Target III gehemmt. Das Protein mit dem inhibierenden Abschnitt Target II wird freigesetzt und bindet an den Transkriptionsfaktor Target I, wodurch dieser inhibiert wird. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsfaktor vor.

Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsfaktors findet keine Expression des Repressorgens statt.

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors TF, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Beispiel 8

5           Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 8  
dargestellte Konfiguration.

- 10           1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 7  
beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende  
Proteine codieren.
2. Es wird eine Genanordnung für einen  
Transkriptionsfaktor bereitgestellt (Target I).
- 15           3. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt,  
welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des  
Coliphagen P1 codiert. Diese Rekombinase entspricht  
dem zweiten regulatorischen Faktor.
- 20           4. Eine Reporter-genanordnung mit den Reporter-genen Leu2  
und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei  
beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom  
Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor  
besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an  
25           die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und  
eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende  
lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.
- 30           a. Wie auch unter Beispiel 7 beschrieben, findet,  
sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte  
Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den  
Proteinen statt, womit ein aktiver  
Transkriptionsfaktor vorliegt. Der aktive  
Transkriptionsfaktor Target I bindet an eine auf  
35           der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA  
das für die Cre-Rekombinase codierende Cre-Gen  
enthält. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors

wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder invertiert über Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene, wobei sie mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach einer Elimination als auch nach einer Inversion werden keine funktionellen Reportergene exprimiert. Demzufolge findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.

- b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsansatz wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine Target II und Target III gehemmt. Das Protein mit dem inhibierenden Abschnitt Target II wird freigesetzt und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor, wodurch dieser inhibiert wird. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors bindet, je nach Versuchsbedingungen, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsfaktors bindet kein Transkriptionsfaktor an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert. Entsprechend werden die Reportergene Leu2 und/oder LacZ weder eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

5           Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase, gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene erst ermöglicht wird.

#### Beispiel 9

10

Die Funktionsweise des Verfahrens wird am Beispiel des Tet-Repressors und dessen spezifische Inhibierung durch Tetracyclin näher erläutert.

15

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 9 angegebene Konfiguration dar.

20

1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für den ersten regulatorischen Faktor AD1-Tet codiert. Dieser regulatorische Faktor bindet an DNA-Bereiche einer DNA (Tet-Bindungsstelle), die für den zweiten regulatorischen Faktor, den Repressor LexA-GST, codiert.

25

2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung des Repressors LexA-GST mit einer Bindestelle auf der DNA (Tet-Bindestelle) für den unter 1 genannten ersten regulatorischen Faktor AD1-Tet bereitgestellt.

30

3. Eine Reportergenordnung mit den Reportergenen Leu2 und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer

35



Transkriptionsfaktor Gal4) bindet, aus einer oder mehreren LexA Bindungsstellen, an die ein LexA-GST binden kann, und einer TATA-Box für die Initiation der basalen Transkription zusammen.

5

10

15

20

25

30

35

a. Durch die Expression des Fusionsklones AD1-Tet (erster regulatorischer Faktor) wird die Expression des Repressors LexA-GST (zweiter regulatorischer Faktor) stimuliert. Dieses Repressorprotein wiederum reprimiert durch die Bindung an die LexA-Bindestelle des in Figur 9 beschriebenen LacZ- bzw. LEU2-Promotors die vom ersten regulatorischen Faktor unabhängige Gal4-aktivierte Expression der Reportergene LacZ und Leu2. Da die Gal4-aktivierte Expression der Reportergene durch Glukose inhibiert und erst auf Galaktose stimuliert wird, können diese Hefen auf Leucin-defizienten Medien nicht wachsen und bleiben auf X-Gal-haltigem Medium weiß (Tabelle 1). Besitzt das Medium Galaktose als Zuckerquelle, bleibt der Gal1-LexA-Promotor durch die AD1-Tet abhängige Expression des LexA-GST Repressors weiter inhibiert: die Hefekolonien bleibt weiß und wachsen auf Leucin-defizienten Medien nicht.

b. In Abhängigkeit steigender Tetracyklinkonzentration (Figur 9 sowie Tabelle 1 und 2) wird die Bindung des AD1-Tet-Proteins an den Tet-abhängigen Promotor des LexA-GST Repressors spezifisch inhibiert. Die hier verwendete, steigende Tetracyklinkonzentration inhibiert das generelle Wachstum der Hefen nicht. Der zweite regulatorische Faktor ist nun nicht mehr in der Lage, die Aktivität des Reportersystems zu inhibieren. Die Hefezellen werden nun mit Galaktose als Zuckerquelle und X-

Gal als Substrat für das Reportersystem blau und können auf Leucin-defizienten Medien wachsen. Glukose-haltiges Medium dagegen inhibiert die Aktivität des endogenen Transkriptionsfaktors Gal4. Die Hefen wachsen nicht auf Leucin-defizienten Medien und bleiben auf X-Gal-haltigen Medienplatten weiß. Andere Antibiotika wie Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Carbenicillin haben keine derartig reprimierende Wirkung auf den ersten regulatorischen Faktor AD1-Tet (Tabelle 1). Auf Glukose-haltigen Platten wird Gal4 unabhängig vom ersten und zweiten regulatorischen Faktor inhibiert, weswegen auf derartigen Medien die Hefen nicht wachsen und weiß bleiben.

Tabelle 1:

Tetracyklin- zugabe	Wachstum auf LEU-		Blaufärbung auf X-Gal	
	Glukose	Galaktose	Glukose	Galaktose
--	--	--	weiß	weiß
++	--	++	weiß	blau

Tabelle 2: (nur die Ergebnisse der Galaktose-haltigen Platten dargestellt)

a)

Verwendetes Antibiotikum	Eingesetzte Konzentrationen [µg/ml]			
	0	5	50	250
Tetracyclin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	++ / blau
Ampicillin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß
Kanamycin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß
Carbenicillin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß
Chloramphenicol	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß

Wachstum auf LEU- / Blaufärbung auf X-Gal

5

b)

Verwendetes Antibiotikum	Eingesetzte Konzentrationen [µg/ml]							
	0	5	50	100	150	200	250	300
Tetracyclin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	++ / blau	++ / blau	++ / blau

Wachstum auf LEU- /  
Blaufärbung auf X-Gal

c) Nachweis der Funktionsweise der einzelnen Elemente im Assay

10

- AD1-Tet als Transkriptionsfaktor:

Um nachzuweisen, daß der Fusionsklon AD1-Tet (erster regulatorischer Faktor) in der Hefe funktionell exprimiert, in den Kern transportiert und dort effizient an die DNA-Konsensussequenz gebunden wird und von dort aus die Transkription eines Genes aktivieren kann, wurde der folgende Assay durchgeführt:

15

20

Auf Galaktose-haltigen Medienplatten wird AD1-Tet exprimiert und ist damit in der Lage, an die Tet-Bindestelle eines entsprechenden Promotors vor dem LacZ-Gen zu binden und von dort die Expression des Reporter genes LacZ zu aktivieren. Dieses wiederum kann durch die Umwandlung des im Medium enthaltenen, farblosen Substrats X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff nachgewiesen werden. Da Glukose die Expression des AD1-Tet-Proteins inhibiert, findet auch keine Expression des Reporter genes LacZ statt. Die Kolonien bleiben weiß.

- Tetracyclin als spezifischer Inhibitor des Transkriptionsfaktors Tet-AD

Um nachzuweisen, daß Tetracyclin die Bindungsaktivität des AD1-Tet-Proteins spezifisch zu inhibieren vermag, wurden zusätzlich steigende Konzentrationen des Antibiotikums auf die Medienplatten gegeben:

Tabelle 3:

25

	Eingesetzte Konzentrationen Tetracyclin [ $\mu\text{g/ml}$ ]							
	0	5	50	100	150	200	250	300
Blaufärbung auf X-Gal	blau	blau	blau	blau	blau	weiß	weiß	weiß
Galaktose-haltige Platten mit Leucin im Medium	++	++	++	++	++	++	++	++
Glukose-haltige Platten mit Leucin im Medium	++	++	++	++	++	++	++	++

Wie die experimentellen Daten zeigen, kann in Abhängigkeit steigender Tetracyclinkonzentration (Tabelle 3) die Bindung des AD1-Tet-Proteins an den

Promotor des Reportergenes LacZ spezifisch inhibiert werden. Bei einer Konzentration von 200 µg/ml Tetracyclin im Medium bleiben die Hefezellen weiß. Das generelle Wachstum der Hefezellen wird dadurch nicht wesentlich beeinflusst, wie die Ergebnisse auf den Glukose- und Galaktose-haltigen Platten zeigen (das Wachstum wird durch "++" dargestellt).

- LexA-GST als Repressor

Um nachzuweisen, daß der zweite regulatorische Faktor (LexA-GST) in der Hefe funktionell exprimiert, in den Kern transportiert und dort effizient an die LexA-Konsensussequenz gebunden wird und von dort aus die Transkription eines Genes inhibieren kann, wurde der folgende Assay durchgeführt.

Im Gegensatz zur Negativkontrolle CTF2 (einem Mitglied der NFI-Familie) bleiben die Hefeklone auf X-Gal- und Galaktose-haltigem Medium weiß. Dies bedeutet, daß der LexA-GST-Fusionsklon zwischen der Gal4-Bindestelle und dem Transkriptionsstart des Reportergens bindet und damit die Aktivität des endogenen Hefetranskriptionsfaktors Gal4 inhibiert. CTF2 dagegen ist nicht in der Lage die LexA-Bindestellen zu erkennen und kann so die Aktivität von Gal4 nicht reprimieren. Das Reportergen LacZ wird exprimiert und die Kolonien färben sich blau (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905).

Beispiel 10

Identifikation spezifischer Peptid-Inhibitoren von CTF7

Um inhibierende Peptidsequenzen gegen den in Hefe transkriptionsaktiven CTF7, einem Mitglied der NFI-

Familie (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905), zu screenen, wurde der folgende Assay (Fig. 10) durchgeführt.

- 5       Dieses Beispiel stellt die in Fig. 10 angegebene Konfiguration dar.
- 10       1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für einen ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7 codiert. Das entsprechende Plasmid pEG-CTF7 enthält die Genanordnung für den ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7. Dieser erste regulatorische Faktor LexA-CTF7 bindet an DNA-Bereiche einer DNA (LexA-Bindestelle), die für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST codiert.  
15
  2. Des weiteren wird eine Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST mit einer Bindestelle auf der DNA (LexA-Bindestelle) für den unter 1  
20       genannten ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7 bereitgestellt.
  - 25       3. Eine Reporteranordnung mit den Reportergen Leu2 und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer  
30       Transkriptionsfaktor Gal4) bindet, aus einer Tet-Bindungsstelle, an die Tet-GST binden kann, und einer TATA-Box für die Initiation der basalen Transkription zusammen.
  - 35       a. Wird der Versuchsanordnung kein Inhibitor zugesetzt, liegt ein aktiver erster

regulatorischer Faktor LexA-CTF7 vor, der die Expression des Tet-GST Gens positiv reguliert. Tet-GST bindet an die oben genannte Tet-GST Bindungsstelle und reprimiert die Expression des Reporter gens LacZ und/oder Leu2, d.h. es findet kein Wachstum der Wirtsorganismen statt, eine Farbreaktion ist nicht nachzuweisen.

- b. Nach Zugabe eines Trx-Peptids wird die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF7 gehemmt. Dies ist auf eine Hemmung der Interaktion von LexA-CTF7 mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen. Es findet keine Expression des Tet-GST-Gens statt. Somit steht kein Tet-GST zur Verfügung, und das dem Promotor nachgeschaltete Reporter gen LacZ und/oder Leu2 wird durch einen induzierbaren endogenen Transkriptionsfaktor Gal4 stark exprimiert. Infolgedessen wachsen die Hefen in Leucin-defizienten Medien, und nach Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.

Die Zugabe des Trx-Peptids führt also gemäß der vorliegenden Erfindung zu einer Expression des Reporter gens/der Reporter gene, indem der zweite regulatorische Faktor Tet-GST nicht bzw. vermindert reprimiert wird.

Im Detail wird der Versuch wie folgt durchgeführt:

Der Hefestamm INVSc1 wurde mit den in Fig. 10 dargestellten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf einer Glukose-haltigen Minimalmediumplatte (20 x 20 cm; Uracil-,





Tryptophan- und Histidin-defizient zur Selektion auf die Plasmide) ausgestrichen.

Der Vektor pEG-CTF7 (entspricht dem ersten regulatorischen Faktor) und wurde nach Altmann et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905) hergestellt.

pYES-Leu2/34-TetGST (Plasmid, welches den zweiten regulatorischen Faktor TetGST codiert und das Reportersystem beinhaltet).

Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pYES2. Die LexA-Bindestellen Oligos wurden in die XhoI Schnittstelle des inaktiven Gal1/Gal10 Promotors ligiert, der gesamte Promotor mit BamHI isoliert und zusammen mit dem Fusionsklon Tet-GST in den Polylinker des Plasmides pYES2 kloniert. Der Gal1-Promotor war zuvor über die SpeI-Schnittstellen deletiert worden. In die mit Klenow-Polymerase behandelte NheI-Schnittstelle dieses Konstruktes erfolgte die Klonierung des über BamHI isolierten, ebenfalls mit Klenow behandelten LacZ-, bzw. des über PCR erhaltenen Leu2-Fragments. In die dabei rekonstituierte BamHI-Schnittstelle erfolgte die Ligation des Gal/Tet-Promotors. Dieser wurde durch die Klonierung von Tet-Oligos und die anschließende Ligation von Gal4-Bindestellen in die XhoI-Schnittstelle des inaktiven Gal1/10-Promotors erhalten.

pYES2(TRP1)TRX-Oligo-Pool (Peptid-Pool exprimierendes Konstrukt; Komplexität ca.  $10^5$ )

Durch die Ligation des Trp1-Gens in den mit ApaI und NheI linearisierten pYES2-Vektor, wurde das

Ura3-Gen zerstört und das Plasmid auf Tryptophandefizienz selektierbar. Anschließend wurde das über PCR isolierte Trx-Gen in den EcoRI, XhoI linearisierten Vektor kloniert. Die Ligation der Pool-Fragmente erfolgte über die RsrII-Schnittstelle des Trx-Konstruktes.

Die ca. 30.000 Kolonien wurden vereinigt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten besaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren Leucin-, Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen waren 8 Kolonien (A, B, C, D, E, F, G, H) gewachsen (Tabelle 4). Aus diesen wurden zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit CTF7 und Tet-GST in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt des Leu2 das LacZ-Gen auf dem Reporterplasmid, sodaß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 4). Desweiteren wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (LacZ und Leu2) und einem von CTF7 verschiedenen Transkriptionsfaktor LexA-TA<sub>1</sub> in Hefen transformiert. Auf diese Weise können CTF7 spezifisch inhibierende Peptide von unspezifischen Inhibitionen unterschieden werden.

Tabelle 4:

Identifizierte Inhibitoren	Wachstum auf Leucin-defizienten Platten	Blaufärbung auf X-Gal-haltigen Platten		Inhibierung von LexA-TA <sub>1</sub> auf Galaktose
		Glukose	Galaktose	
A	+	-	+	-
B	+	+	+	n.b.
C	+	+	+	n.b.
D	+	-	+	+
E	+	-	+	-
F	+	-	+	-
G	+	-	+	-
H	+	-	+	+

- 5 Die Inhibitoren B und C färbten sich auch auf Glukose-haltigen Platten, also unabhängig von der Galaktose-induzierten TRX-Peptidexpression, blau. Dies bedeutet, daß in den entsprechenden Klonen keine inhibierenden Peptide exprimiert werden,
- 10 welche die Blaufärbung verursachen. Von den Peptiden A, D, E, F, G und H stellten sich D und H als unspezifisch heraus, da sie auch in der Lage waren die LexA-TA<sub>1</sub> Domäne zu inhibieren. Die Inhibitoren A, E, F und G dagegen waren nur in der
- 15 Lage die Aktivität von CTF7 zu reprimieren (n.b.: nicht bestimmt).

#### Beispiel 11

- 20 Identifikation spezifischer Inhibitoren der Protein-Protein-Wechselwirkung LexA-CTF2/AD1-TIM

Der in Fig. 11 beschriebene Assay wird durchgeführt, um inhibierende Peptidsequenzen gegen die in Hefe aktive Protein-Protein-Interaktion LexA-CTF2 und TIM-AD (Altmann (1994) Dissertation) zu screenen. LexA-CTF2 ist ein Fusionskonstrukt aus dem bakteriellen Repressor LexA und CTF2, einem Mitglied der NFI-Familie. Hierzu wird der Hefestamm INVSc1 mit den in Fig. 11 dargestellten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf einer Glukose-haltigen Minimalmediumplatte (20 x 20 cm; Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient zur Selektion auf die Plasmide) ausgestrichen.

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 11 dargestellte Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Hybridproteine des Transkriptionsregulators codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein LexA-CTF2, einem Fusionskonstrukt aus dem bakteriellen Repressor LexA und CTF2, einem Mitglied der NFI-Familie (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905) codiert, sowie eine weitere Anordnung für ein Hybridprotein TIM-AD (Altmann (1994), Dissertation).

pSH-CTF2/TIM (entspricht dem ersten regulatorischen Faktor) ist das entsprechende Plasmid, welches den ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF2/AD1-TIM codiert.

2. pYES-Leu2/34-TetGST (Plasmid, welches den zweiten regulatorischen Faktor TetGST codiert und das Reportersystem beinhaltet).

3. pYES2(TRP1)TRX-Oligo-Pool (Peptid-Pool exprimierendes Konstrukt; Komplexität ca.  $10^5$ ).

- 5 a. Der erste regulatorische Faktor LexA-CTF2/AD1-TIM setzt sich, wie oben beschrieben, aus zwei Fusionsproteinen LexA-CTF2 und AD1-TIM zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine ein aktiver erster regulatorischer Faktor pSH-CTF2/TIM vorliegt (siehe Fig. 11a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsregulator ist vorhanden. Der aktive Transkriptionsregulator LexA-CTF2/AD1-TIM bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (LexA-Bindestelle), welche für das Tet-GST Gen codiert, und bewirkt eine Expression von Tet-GST. Tet-GST bindet an die entsprechende Bindestelle (Tet-GST Bindestelle) im Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reprotergene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium noch eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.
- 15
- 20
- 25 b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. ein Trx-Peptid, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionsproteine LexA-CTF2 und AD1-TIM gehemmt. Es liegt nun kein aktiver erster regulatorischer Faktor vor.
- 30

Aufgrund des inaktiven ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2/AD1-TIM findet keine Expression des Tet-GST Gens (Repressor-Gen) statt. Da kein

35 Repressor Tet-GST vorliegt, werden, nach Bindung

eines weiteren Transkriptionsfaktors Gal4, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ exprimiert.

Im Detail wird der Versuch, wie folgt, durchgeführt:

5

10

15

20

25

Die ca. 35.000 Kolonien wurden eingesammelt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten besaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren Leucin-, Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen sind 6 Kolonien (A, B, C, D, E, F) gewachsen. Aus diesen wurden zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit LexA-CTF2, TIM-AD und Tet-GST in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt dem Leu2 das LacZ-Gen auf dem Reporteplasmid, so daß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 5). Des weiteren wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (LacZ und Leu2) und dem Transkriptionsfaktor LexA-TA1 in Hefen transformiert. Auf diese Weise konnten die TIM-CTF2 Interaktion spezifisch inhibierende Peptide von Unspezifischen abgetrennt werden.

Tabelle 5:

Identifizierte Inhibitoren	Wachstum auf Leucin-defizienten Platten	Blaufärbung auf X-Gal-haltigen Platten		Inhibierung von LexA-TA <sub>1</sub> auf Galaktose
		Glukose	Galaktose	
A	+	+	+	n.b.
B	+	-	+	-
C	+	+	+	n.b.
D	+	-	+	+
E	+	-	+	+
F	+	-	+	-

- Die Inhibitoren A und C färbten sich auch auf Glukose-haltigen Platten, also unabhängig von der Galaktose-induzierten TRX-Peptidexpression, blau. Dies bedeutet, daß in den entsprechenden Klonen keine inhibierenden Peptide exprimiert werden, welche die Blaufärbung verursachen. Von den Peptiden B, D, E und F stellten sich D und E als unspezifisch heraus, da sie auch in der Lage waren, die LexA-TA<sub>1</sub> Domäne zu inhibieren. Dagegen waren die Inhibitoren B und F nicht in der Lage, AD1-Tet zu reprimieren, sind also Inhibitoren für die CTF2-TIM Protein-Protein Wechselwirkung.
- In den dargestellten Versuchen 1 bis 11 ergeben sich bei verschiedenen Inhibitoren qualitative und/oder quantitative Unterschiede bezüglich der inhibitorischen Aktivität, d.h. neben einer vollständigen Hemmung des ersten regulatorischen Faktors sind auch graduelle Abschwächungen der Aktivität des ersten regulatorischen Faktors möglich. Entsprechend sind bei der Expression der Reportergene neben der vollständigen Expression auch graduelle Verstärkungen möglich und nachweisbar.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität mindestens  
5 eines ersten regulatorischen Faktors, welche über die Aktivität mindestens eines Reportersystems nachweisbar ist, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - 10 a. Bereitstellen mindestens eines Reportersystems mit mindestens einer ersten Genanordnung, welche mindestens ein Reportergen aufweist,
  - 15 b. Bereitstellen mindestens einer zweiten Genanordnung, die für mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor codiert, und Wechselwirkung des zweiten regulatorischen Faktors mit Komponenten des Reportersystems, wodurch auf die Aktivität des Reportersystems eingewirkt wird,
  - 20 c. Einwirkung vorzugsweise auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors durch den mindestens einen ersten regulatorischen Faktor, und
  - 25 d. Nachweis der Aktivierung des mindestens einen Reportersystems durch Zugabe mindestens einer inhibitorischen Komponente über das Zusammenwirken der ersten und zweiten regulatorischen Faktoren.
- 30 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erste regulatorische Faktor mit DNA-Abschnitten der für den zweiten regulatorischen Faktor codierenden zweiten Genanordnung wechselwirkt,  
35 wodurch auf die Expression des zweiten regulatorischen Faktors eingewirkt wird.



3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite regulatorische Faktor an DNA-Abschnitte des Reportersystems bindet.
- 5 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine erste regulatorische Faktor ein oder mehrere regulierende Komponenten enthält.
- 10 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die eine oder mehrere regulierende Komponenten ein oder mehrere regulierende Proteine sind.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das regulierende Protein oder die regulierenden Proteine ein oder mehrere Transkriptionsregulatoren sind.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsregulator oder die Transkriptionsregulatoren ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren sind.
- 25 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das regulierende Protein oder die regulierenden Proteine den mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor modifizieren.
- 30 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation des mindestens einen zweiten regulatorischen Faktors durch Kinasierung, Dephosphorylierung, Spaltung, Umfaltung oder Konformationsänderung erfolgt.
- 35

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten, welche  
5 gemeinsam den ersten regulatorischen Faktor bilden, und/oder auf die Aktivität des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors eingewirkt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens einem ersten regulatorischen Faktor und einem DNA-Abschnitt der  
10 mindestens einen zweiten Genanordnung eingewirkt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Beeinflussung der genannten Aktivität des ersten regulatorischen Faktors durch inhibitorische Komponenten zu einer  
15 Einwirkung auf die Genexpression der zweiten Genanordnung führt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Inhibitor über eine Hemmung der Aktivität des regulierenden Proteins zu einer  
20 Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung führt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten eingewirkt wird, wobei die mindestens eine erste Komponente eine  
30 regulatorische Komponente ist oder enthält.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Komponente eine Proteinkomponente ist oder enthält.
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente ein Fusionsprotein ist.
- 10 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Komponente eine inhibitorische Komponente ist oder enthält.
- 15 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Komponente mindestens eine Proteinkomponente ist oder enthält.
- 20 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Proteinkomponente mindestens ein Fusionsprotein ist.
- 25 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Komponente eine Verankerungsfunktion besitzt.
- 30 21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten diese Proteinkomponenten im Cytoplasma lokalisiert sind.
- 35 22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten diese Proteinkomponenten an oder in einer Membran lokalisiert sind.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Zugabe einer inhibitorischen Komponente über eine Hemmung der Wechselwirkung zwischen den mindestens zwei Komponenten die mindestens eine erste Komponente, welche den inhibitorisch wirksamen Abschnitt enthält, freigesetzt wird und mit dem transkriptionsaktivierenden Faktor der Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor interagiert.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der transkriptionsaktivierende Faktor durch den freigesetzten inhibitorisch wirkenden Faktor gehemmt wird, wodurch eine Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung erfolgt.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsorganismen Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, oder eukaryotische Zellen, vorzugsweise Hefen, eingesetzt werden.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Bakterienstamm *Escherichia coli* oder der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wird.
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Genprodukt des mindestens einen Reportergens nachweisbar ist.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis des Genproduktes durch eine oder mehrere Veränderungen des Phänotyps des Wirtsorganismus erfolgt.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens eine Genprodukt des Reportergens Zellwachstum der Wirtsorganismen in Mangelmedium ermöglicht.
- 5
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt des Reportergens Leu2 ist und Zellwachstum in Leucin-defizientem Medium ermöglicht.
- 10
31. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt des Reportergens LacZ Substrate in einer meßbaren Farbreaktion umsetzen kann.
- 15
32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Genanordnungen auf verschiedenen Vektoren angeordnet sind.
- 20
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Genanordnungen auf demselben Vektor angeordnet sind.
- 25
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektoren Plasmide sind.
- 30
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Genanordnungen ins Wirtsgenom integriert sind.
- 35
36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Genanordnung für mindestens einen Repressor codiert.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Repressor auf die Expression des mindestens einen Reportergens einwirkt.
- 5 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, daß der Repressor durch Bindung an Komponenten des Reportersystems wirkt.
- 10 39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des Repressors an Komponenten des Reportersystems durch weitere Agenzien reguliert werden kann.
- 15 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß in ein Reporterplasmid eine LacZ-Leu2 Genanordnung und die Repressor-Genanordnung integriert sind.
- 20 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Genanordnung für mindestens eine Rekombinase codiert und die Reportersysteme Rekombinationselemente enthalten.
- 25 42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekombinase über Rekombinationsprozesse mindestens ein Reportergen eliminiert oder invertiert.
- 30 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 oder 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekombinase die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen P1 ist und das mindestens eine Reportergen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente aufweist.
- 35 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13 und 25 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß der

Transkriptionsregulator mindestens zwei Hybridproteine enthält, wobei die Hybridproteine von einer dritten Genanordnung codiert werden.

- 5 45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß ein erstes Hybridprotein ein Fusionsprotein aus einer DNA-Bindedomäne und einer ersten Proteinkomponente und ein zweites Hybridprotein ein Fusionsprodukt aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist, wobei durch Bindung zwischen den beiden Proteinkomponenten der aktive Transkriptionsregulator entsteht.
- 10
- 15 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einwirkung auf die Wechselwirkung der Hybridproteine über inhibitorische Komponenten erfolgt.
- 20 47. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens zwei Proteinkomponenten von einer fünften Genanordnung codiert werden.
- 25 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente einen Abschnitt, der mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente wechselwirkt, einen Abschnitt, der mit einem Transkriptionsfaktor wechselwirkt sowie einen inhibitorischen Abschnitt enthält, wobei erst nach Hemmung der Wechselwirkung der Bindung zwischen den mindestens zwei Proteinkomponenten die inhibitorisch wirkende erste Proteinkomponente die Expression des mindestens einen zweiten regulatorischen Faktors hemmt.
- 30
- 35

49. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste regulatorische Komponente ein Transkriptionsregulator oder Transkriptionsfaktor der Genanordnung des zweiten regulatorischen Faktors ist, der nach Inhibierung der Wechselwirkung mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente in seiner Aktivität reduziert oder inaktiviert wird, wodurch die Expression des zweiten regulatorischen Faktors gehemmt wird.
50. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß diese inhibitorischen Komponenten Naturstoffe wie Peptide, Nukleinsäuren und Kohlehydrate oder andere chemische Substanzen sind.
51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibitorischen Komponenten durch Mutagenese veränderte Bestandteile des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors sind.
52. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine weitere vierte Genanordnung für die Expression von Peptiden bereitgestellt wird.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46 und 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.



54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression des Repressor-Gens gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
55. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46 und 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.
56. Verfahren nach Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression der Rekombinase gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
57. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24 und 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
58. Verfahren nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression des Repressor-Gens gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
59. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24 und 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß durch die

Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.

5

60. Verfahren nach Anspruch 59, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression der Rekombinase gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

10

61. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 bis 60, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Wirtsorganismus gleichzeitig Genanordnungen für mindestens einen Repressor und mindestens eine Rekombinase bereitgestellt werden.

15

62. Verfahren nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, daß je nach eingestellten Versuchsbedingungen der Repressor oder die Rekombinase oder beide exprimiert werden.

20

63. Verwendung eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 62 zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die bevorzugt als Leitstrukturen einsetzbar sind.

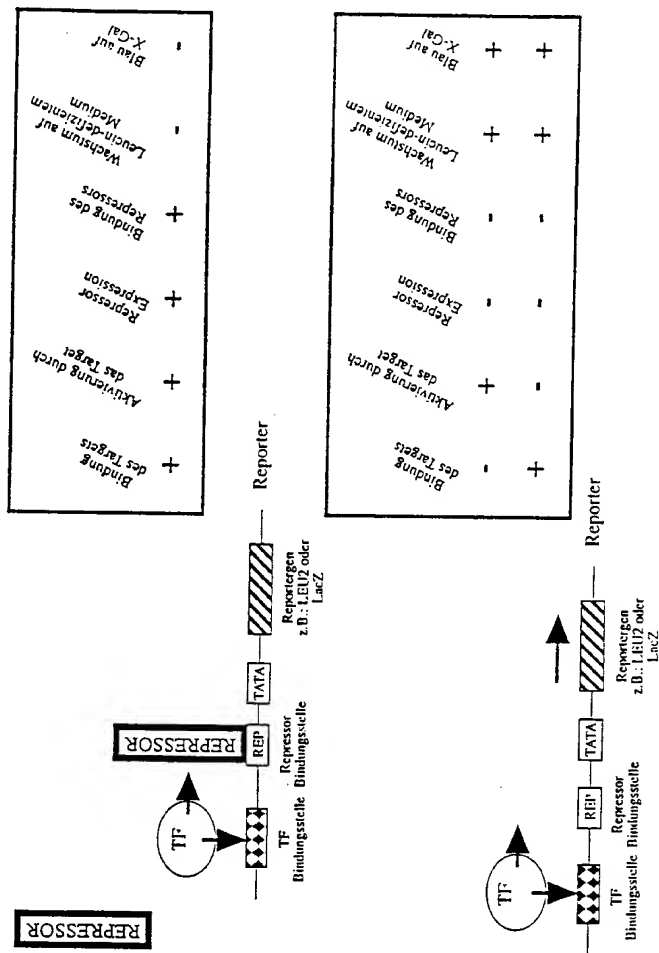
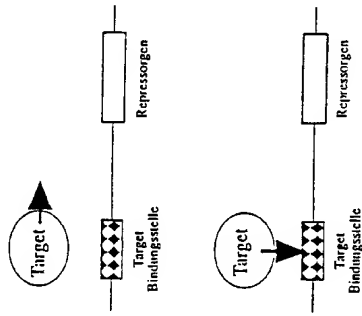
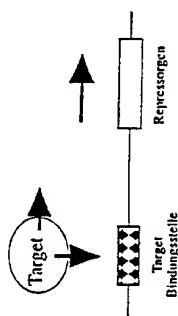
25

64. Verwendung nach Anspruch 63, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierenden Substanzen Peptide sind.

30

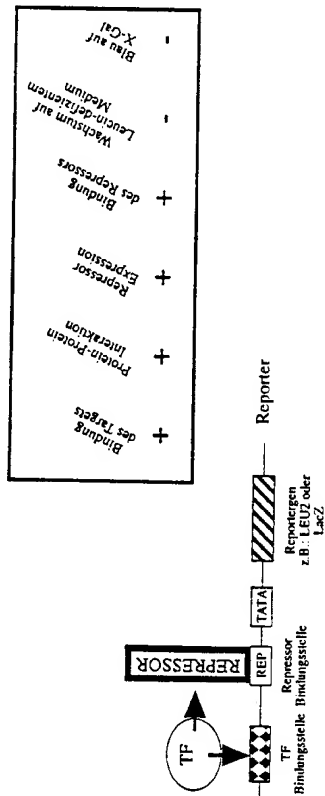
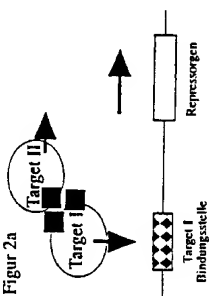
65. Verwendung nach einem der Ansprüche 63 oder 64, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierenden Substanzen und Peptide zur Entwicklung von Therapeutika eingesetzt werden.

## Transkriptionsstimulierende Targets im Repressor-abhängigen Verfahren



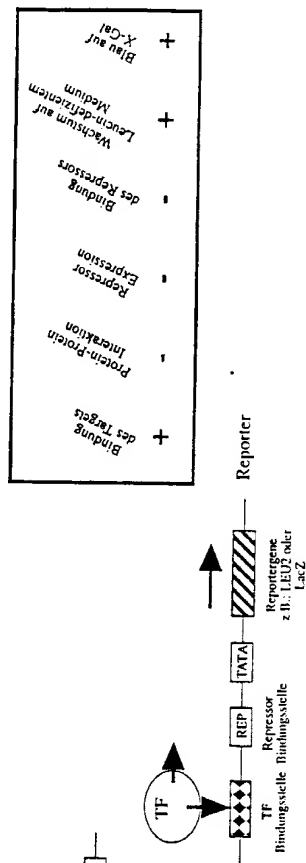
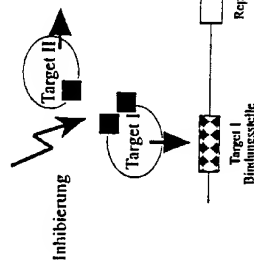
# Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor abhängigen Verfahren

Figur 2a



+ Bindung  
des Targets  
 + Protein-Protein  
Interaktion  
 + Repressor  
Expression  
 + Bindung  
des Repressors  
 + Wachstum auf  
Leucin-defizientem  
Medium  
 + Blau auf  
X-Gal

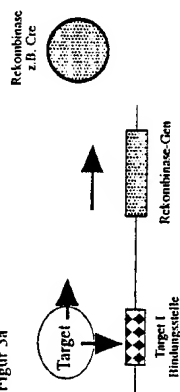
Figur 2b



+ Bindung  
des Targets  
 + Protein-Protein  
Interaktion  
 + Repressor  
Expression  
 + Bindung  
des Repressors  
 + Wachstum auf  
Leucin-defizientem  
Medium  
 + Blau auf  
X-Gal

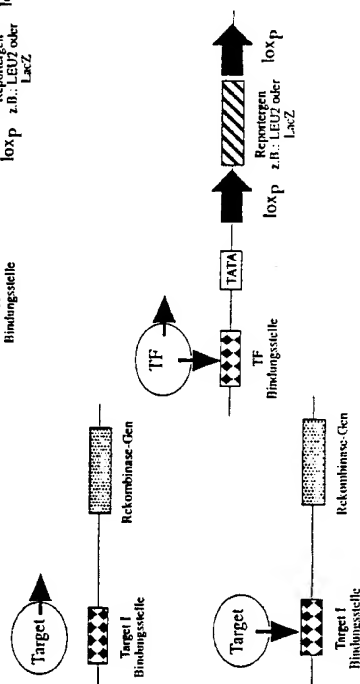
# Transkriptionsstimulierende Targets im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figur 3a



+	+	+	+	+	+
Bindung des Targets	Aktivierung durch das Target	Rekombinase Expression	Rekombination	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium	Blau auf X-Gal

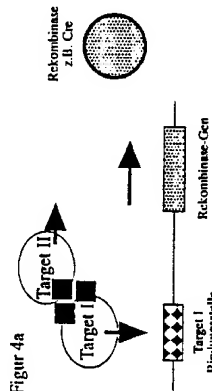
Figur 3b



+	+	+	+	+	+
Bindung des Targets	Aktivierung durch das Target	Rekombinase Expression	Rekombination	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium	Blau auf X-Gal

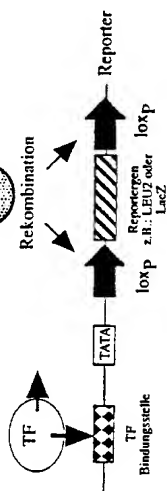
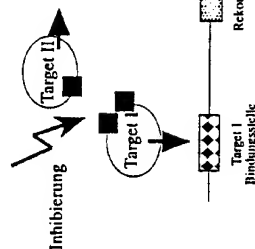
# Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figur 4a

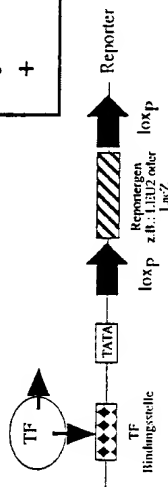


+	Bindung des Targets
+	Protein-Protein Interaktion
+	Expression
+	Rekombination
-	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium
-	Blau auf X-Gal

Figur 4b

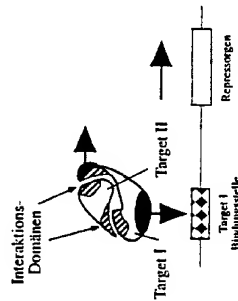


+	Bindung des Targets
+	Protein-Protein Interaktion
+	Expression
+	Rekombination
+	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium
+	Blau auf X-Gal

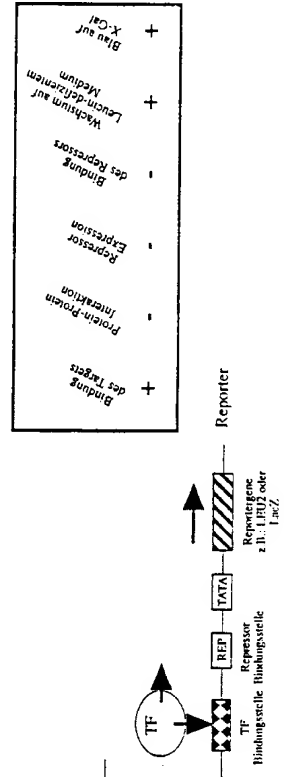
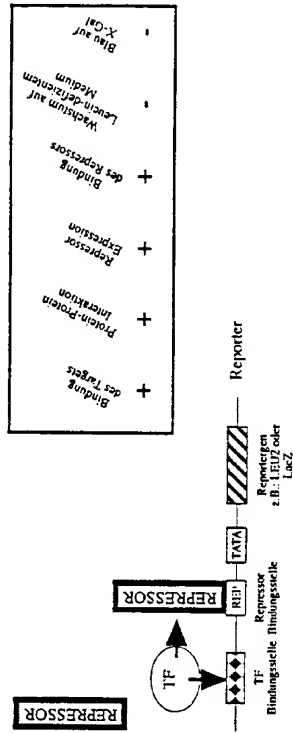
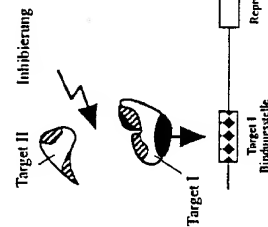


# Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor-abhängigen Verfahren

Figur 5a

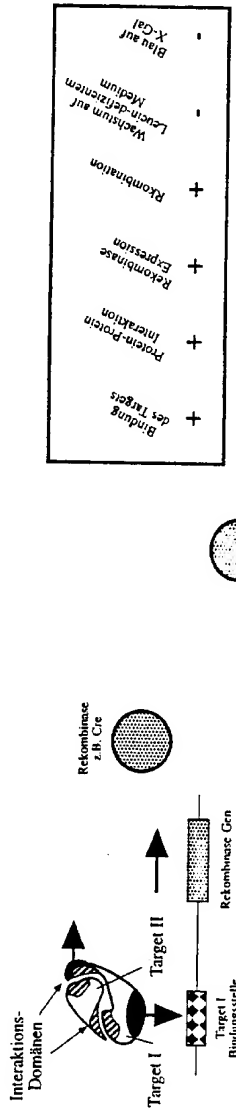


Figur 5b

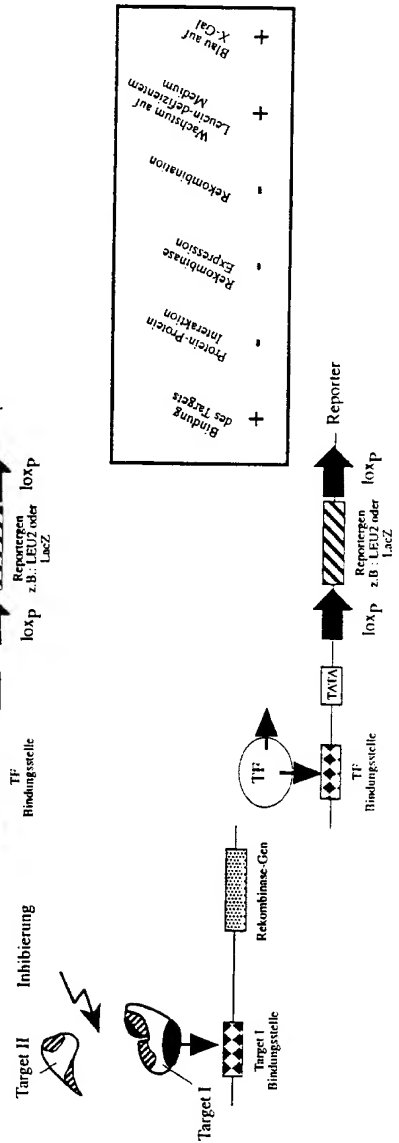


# Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figur 6a



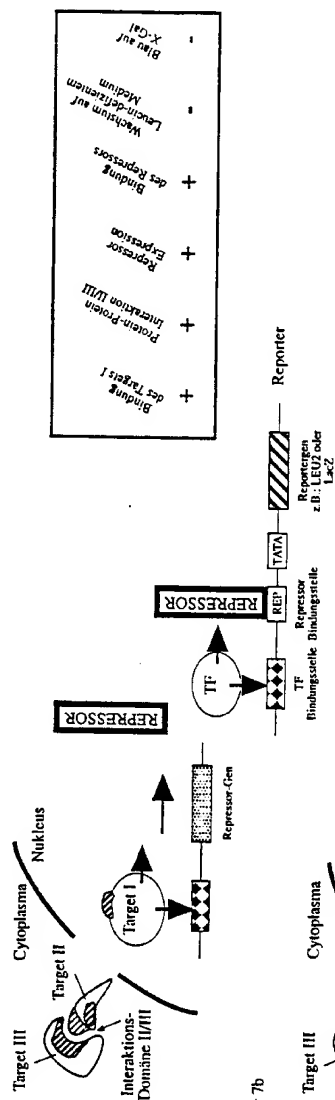
Figur 6b



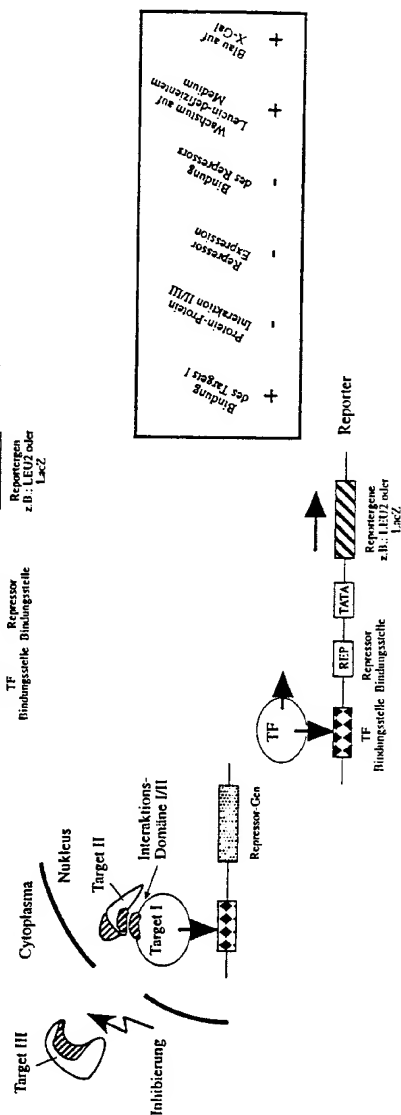


# Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor-abhängigen Verfahren

Figur 7a



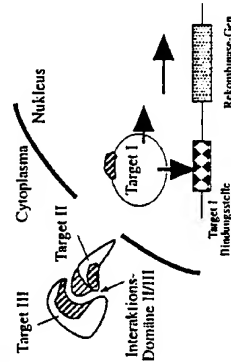
Figur 7b



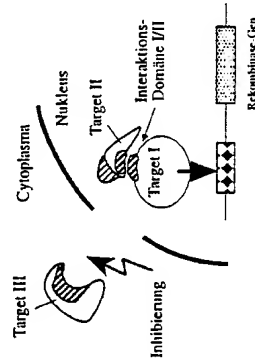
8/11

# Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

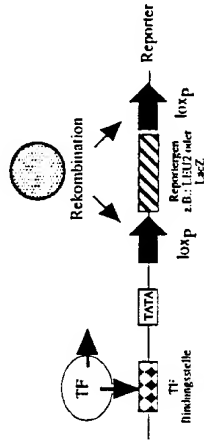
Figur 8a



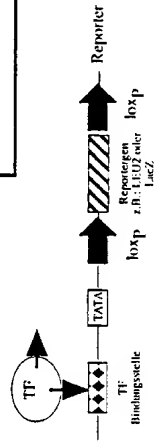
Figur 8b



+	+	+	+	+	+
Bindung I des Targets I	Protein-Protein Interaktion I/III	Rekombinase Expression	Rekombination	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium	Blau auf X-Gal

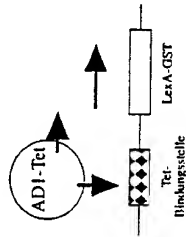


+	+	+	+	+	+
Bindung I des Targets I	Protein-Protein Interaktion I/III	Rekombinase Expression	Rekombination	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium	Blau auf X-Gal



# Repression des transkriptionsstimulierenden Targets AD1-Tet im Repressor-abhängigen Verfahren

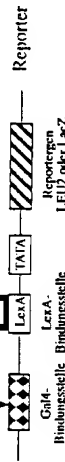
Figur 9a



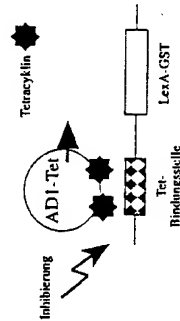
LexA-GST

LexA-GST

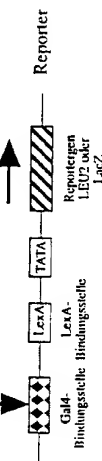
-	Tetracyclin
+	Bindung von AD1-Tet
+	Aktivierung durch von AD1-Tet
+	LexA-GST Expression
+	Bindung von LexA-GST
+	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium
-	Blau auf X-Gal



Figur 9b

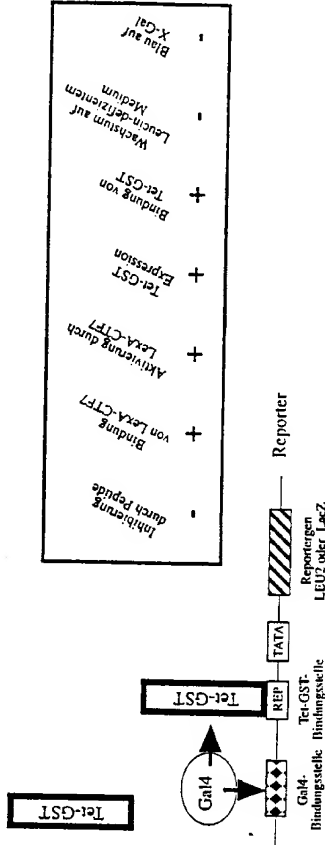
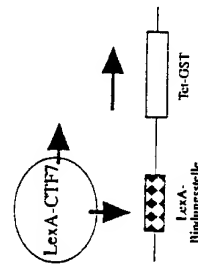


+	Tetracyclin
-	Bindung von AD1-Tet
+	Aktivierung durch von AD1-Tet
-	LexA-GST Expression
-	Bindung von LexA-GST
+	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium
+	Blau auf X-Gal

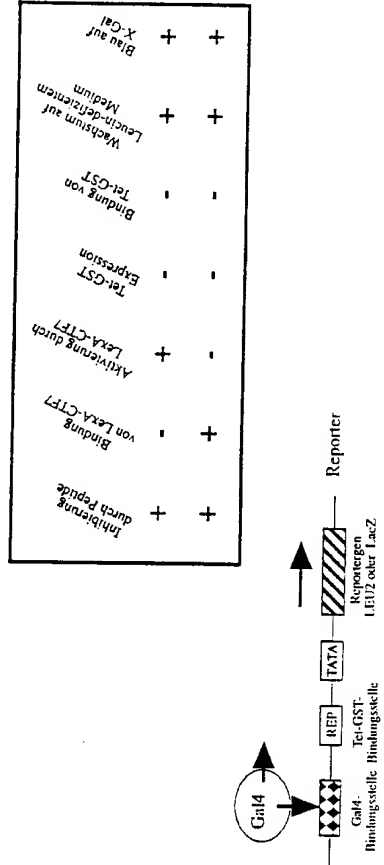
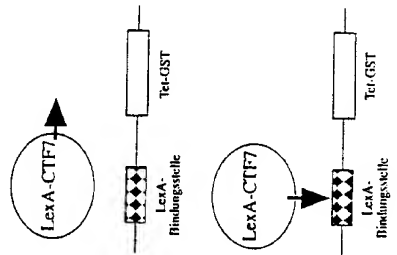


# Repression des transkriptionstimulierenden Targets LexA-CTF7 im Repressor-abhängigen Verfahren

Figur 10a



Figur 10b

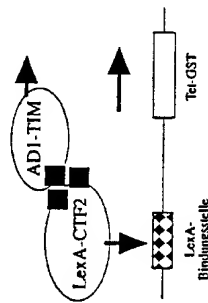


Inhibieren durch Peptide	+	+	+	+
Bindung von LexA-GST	+	+	+	+
Aktivierung durch LexA-GST	+	+	+	+
Tet-GST Expression	+	+	+	+
Bindung von Tet-GST	+	+	+	+
Wachstum auf Leu <sup>-</sup> /in-defizientem Medium	+	+	+	+
Bla auf X-Gal	+	+	+	+

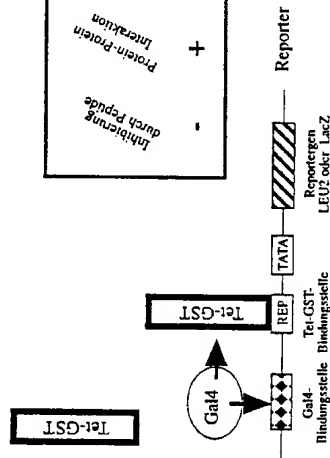
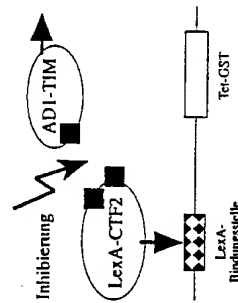
Inhibition durch Peptide						
Bindung von LexA-GFP7	+					
Aktivierung durch LexA-GFP7	+					
Tet-CST Expression	+					
Bindung von Tet-CST	+					
Wachstum auf Leucin-defizientem Medium						
Blaue auf X-Gal						

# Repression der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen LexA-CTF2 und AD1-TIM im Repressor-abhängigen Verfahren

Figur 11a

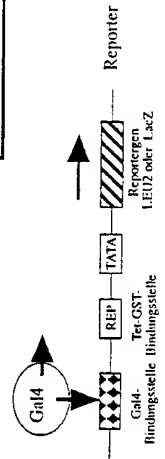


Figur 11b



+	Inhibierung durch peptide
+	Protein-Protein Interaktion
+	Aktivierung durch ADJ-TM
+	Tet-GST Expression
+	Bindung von Tet-GST
-	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium
-	Blau auf X-Gal

+	Inhibierung durch peptide
-	Protein-Protein Interaktion
-	Aktivierung durch ADP-1TM
-	Ter-GST Expression
-	Bindung von Ter-GST
+	Wachstum auf Leucin-defizientem Medium
+	Blau auf X-Gal



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 95/00297

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/00 C12N15/67 C12N15/70 C12N15/81 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 89, no. 12, 15 June 1992 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 5547-5551, M. GOSSEN AND H. BUJARD 'Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters'	1-5, 10-14, 25-27
Y	see page 5548, right column, paragraph 4 - page 5551, left column, paragraph 2	6-9, 29-40, 44-53, 57, 58, 63-65
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 1995

Date of mailing of the international search report

04-07-1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2220 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/00297

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THE PLANT JOURNAL, vol. 2, no. 3, 1992 BLACKWELL, OXFORD, UK, pages 397-404, C. GATZ ET AL. 'Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants'	1-5, 25-28
Y	see page 357, right column, line 36 - page 402, right column, paragraph 2	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 227, no. 2, June 1991 SPRINGER INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL, pages 229-237, C. GATZ ET AL. 'Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco'	1-5, 25-28
Y	the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- WO-A-91 16429 (GEN HOSPITAL CORP) 31 October 1991 see page 6, line 27 - page 26, line 2	1-5,50
Y	the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- WO-A-91 16456 (GEN HOSPITAL CORP) 31 October 1991 see page 4, line 10 - page 20, line 8; claims 1-8	1-5,50
Y		6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- WO-A-92 05286 (BRENT ROGER ;GOLEMIS ERICA (US); LECH KAREN F (US); ANDERSON CATHE) 2 April 1992 cited in the application	1-5,50
Y	see page 12, line 1 - page 26, line 9; claims 1-20; examples 1-6	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
	--- -/--	

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International A. : Japon No

PCT/EP 95/00297

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 86, no. 14, July 1989 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 5473-5477, G.W. BYRNE AND F.H. RUDDLE 'Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice' the whole document</p> <p>---</p>	<p>6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65</p>
Y	<p>PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 88, no. 21, 1 November 1991 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 9578-9582, C.-T. CHIEN ET AL. 'The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest' the whole document</p> <p>---</p>	<p>6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65</p>
Y	<p>SCIENCE, vol. 257, 31 July 1992 AAAS, WASHINGTON, DC, US, pages 680-682, X. YANG ET AL. 'A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system' the whole document</p> <p>---</p>	<p>6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65</p>
Y	<p>WO-A-93 10250 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27 May 1993</p> <p>see page 11, line 1 - page 15, line 18 see page 26, line 16 - page 57, line 19 see claims 16-19</p> <p>---</p>	<p>6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65</p>
Y	<p>WO-A-93 15227 (UNIV DUKE) 5 August 1993</p> <p>see page 5, line 22 - page 9, line 30; claims 15-35</p> <p>---</p>	<p>6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65</p>
A	<p>BIOL CHEM HOPPE-SEYLER 373 (9). 1992. 857. CODEN: BCHSEI ISSN: 0177-3593, ALTMANN H ET AL. 'Nuclear factor I a DNA-binding protein that can act as a transcriptional activator in yeast' Autumn meeting of the gesellschaft für biologische chemie (German society for biological chemistry), Rostock, Germany, September 24-26, 1992;</p> <p>---</p>	<p>1-4, 25-27</p>
	---	

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 95/00297

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO-A-94 04672 (DNX CORP ;BYRNE GUERARD (US)) 3 March 1994  the whole document ---	1-5,10, 11, 14-17, 25-28
P,X	WO-A-94 09133 (GEN HOSPITAL CORP) 28 April 1994  see page 5, line 8 - page 26, line 19; claims 1-14 ---	1-5, 10-19, 23, 25-28, 34, 36-39,50
P,X	WO-A-94 29442 (BASF AG ;BUJARD HERMANN (DE); GOSSEN MANFRED (DE); SALFELD JOCHEN) 22 December 1994 the whole document -----	1-5, 10-14, 33-39

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/00297

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116429	31-10-91	AU-A- 7676691 EP-A- 0528827 US-A- 5322801	11-11-91 03-03-93 21-06-94
WO-A-9116456	31-10-91	AU-A- 7667191	11-11-91
WO-A-9205286	02-04-92	AU-B- 650677 AU-A- 8627291 CA-A- 2092000 CN-A- 1065092 CZ-A- 9300496 EP-A- 0550592 HU-A- 66827 JP-T- 6503713 ZA-A- 9107616	30-06-94 15-04-92 25-03-92 07-10-92 16-02-94 14-07-93 30-01-95 28-04-94 24-09-93
WO-A-9310250	27-05-93	CA-A- 2123906 EP-A- 0614491	27-05-93 14-09-94
WO-A-9315227	05-08-93	AU-B- 3609693	01-09-93
WO-A-9404672	03-03-94	AU-B- 5099393 CA-A- 2143326	15-03-94 03-03-94
WO-A-9409133	28-04-94	US-A- 5322801 AU-B- 5325594	21-06-94 09-05-94
WO-A-9429442	22-12-94	AU-B- 7108194	03-01-95

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales nzeichen  
PCT/EP 95/00297

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/00 C12N15/67 C12N15/70 C12N15/81 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 89, Nr. 12, 15. Juni 1992 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US,; Seiten 5547-5551, M. GOSSEN AND H. BUJARD 'Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters'	1-5, 10-14, 25-27
Y	siehe Seite 5548, rechte Spalte, Absatz 4 - Seite 5551, linke Spalte, Absatz 2	6-9, 29-40, 44-53, 57, 58, 63-65
	---	--/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Juni 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04 -07- 1995

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales  
PCT/EP 95/00297

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	THE PLANT JOURNAL, Bd. 2, Nr. 3, 1992 BLACKWELL, OXFORD, UK, Seiten 397-404, C. GATZ ET AL. 'Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants'	1-5, 25-28
Y	siehe Seite 357, rechte Spalte, Zeile 36 - Seite 402, rechte Spalte, Absatz 2	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 227, Nr. 2, Juni 1991 SPRINGER INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL, Seiten 229-237, C. GATZ ET AL. 'Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco'	1-5, 25-28
Y	the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- WO-A-91 16429 (GEN HOSPITAL CORP) 31.Oktober 1991 siehe Seite 6, Zeile 27 - Seite 26, Zeile 2	1-5,50
Y	the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- WO-A-91 16456 (GEN HOSPITAL CORP) 31.Oktober 1991 siehe Seite 4, Zeile 10 - Seite 20, Zeile 8; Ansprüche 1-8	1-5,50
Y		6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
X	--- WO-A-92 05286 (BRENT ROGER ;GOLEMIS ERICA (US); LECH KAREN F (US); ANDERSON CATHE) 2.April 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 12, Zeile 1 - Seite 26, Zeile 9; Ansprüche 1-20; Beispiele 1-6	1-5,50
Y		6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
	---	
	-/--	

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales  
PCT/EP 95/00297

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., Bd. 86, Nr. 14, Juli 1989 NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US;, Seiten 5473-5477, G.W. BYRNE AND F.H. RUDDLE 'Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice' the whole document ---	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., Bd. 88, Nr. 21, 1.November 1991 NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US;, Seiten 9578-9582, C.-T. CHIEN ET AL. 'The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest' the whole document ---	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
Y	SCIENCE, Bd. 257, 31.Juli 1992 AAAS,WASHINGTON,DC,US, Seiten 680-682, X. YANG ET AL. 'A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system' the whole document ---	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
Y	WO-A-93 10250 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27.Mai 1993  siehe Seite 11, Zeile 1 - Seite 15, Zeile 18 siehe Seite 26, Zeile 16 - Seite 57, Zeile 19 siehe Ansprüche 16-19 ---	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
Y	WO-A-93 15227 (UNIV DUKE) 5.August 1993  siehe Seite 5, Zeile 22 - Seite 9, Zeile 30; Ansprüche 15-35 ---	6-9, 29-40, 44-53, 57,58, 63-65
	---	
	-/--	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Anzeichen

PCT/EP 95/00297

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIOL CHEM HOPPE-SEYLER 373 (9). 1992. 857. CODEN: BCHSEI ISSN: 0177-3593, ALTMANN H ET AL. 'Nuclear factor I a DNA-binding protein that can act as a transcriptional activator in yeast' Autumn meeting of the gesellschaft für biologische chemie (German society for biological chemistry), Rostock, Germany, September 24-26, 1992; ---	1-4, 25-27
P,X	WO-A-94 04672 (DNX CORP ;BYRNE GUERARD (US)) 3.März 1994  the whole document ---	1-5,10, 11, 14-17, 25-28
P,X	WO-A-94 09133 (GEN HOSPITAL CORP) 28.April 1994  siehe Seite 5, Zeile 8 - Seite 26, Zeile 19; Ansprüche 1-14 ---	1-5, 10-19, 23, 25-28, 34, 36-39,50
P,X	WO-A-94 29442 (BASF AG ;BUJARD HERMANN (DE); GOSSEN MANFRED (DE); SALFELD JOCHEN) 22.Dezember 1994 the whole document -----	1-5, 10-14, 33-39

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Zeichen

PCT/EP 95/00297

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9116429	31-10-91	AU-A- 7676691 EP-A- 0528827 US-A- 5322801	11-11-91 03-03-93 21-06-94
WO-A-9116456	31-10-91	AU-A- 7667191	11-11-91
WO-A-9205286	02-04-92	AU-B- 650677 AU-A- 8627291 CA-A- 2092000 CN-A- 1065092 CZ-A- 9300496 EP-A- 0550592 HU-A- 66827 JP-T- 6503713 ZA-A- 9107616	30-06-94 15-04-92 25-03-92 07-10-92 16-02-94 14-07-93 30-01-95 28-04-94 24-09-93
WO-A-9310250	27-05-93	CA-A- 2123906 EP-A- 0614491	27-05-93 14-09-94
WO-A-9315227	05-08-93	AU-B- 3609693	01-09-93
WO-A-9404672	03-03-94	AU-B- 5099393 CA-A- 2143326	15-03-94 03-03-94
WO-A-9409133	28-04-94	US-A- 5322801 AU-B- 5325594	21-06-94 09-05-94
WO-A-9429442	22-12-94	AU-B- 7108194	03-01-95